

Die protektive Rolle der konservierten Serinprotease HtrA1 in der Alzheimerschen Krankheit

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Annette Tennstädt

aus Frechen
April 2009

Gutachter:
Prof. Ehrmann, Prof. Bayer, Prof. Nalbant

Prüfungsdatum:
14.07.09

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

Launay, S., Maubert, E., Lebeurrier, N., Tennstaedt, A., Campioni, M., Docagne, F., Gabriel, C., Dauphinot, L., Potier, M. C., Ehrmann, M., Baldi, A. und Vivien, D. (2008), 'HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival', *Cell Death Differ*, 15 (9), 1408-16.

In Vorbereitung:

Tennstaedt, A., Truebestein, L., Hauske, P., Schmidt, N., Irle, I., Kaiser, M., Brandt, R., Sickmann, A., Egensperger, R., Baldi, A., Dehmelt, L. und Michael E., 'HtrA1 is a tau protease'

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VII |
| TABELLENVERZEICHNIS | IX |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | X |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Protein-Ablagerungen in AD | 2 |
| 1.1.1 Die β -Amyloiden-Plaques | 2 |
| 1.1.1.1 Die Struktur des APP und seine physiologische Bedeutung | 3 |
| 1.1.1.2 Die nicht-amyloidogene und amyloidogene APP-Prozessierung | 4 |
| 1.1.1.3 Fehlfaltung, Aggregation und Anreicherung des A β -Peptids | 6 |
| 1.1.2 Die neurofibrillären Bündel | 7 |
| 1.1.2.1 Funktion des Mikrotubuli-Netzwerkes, der MAPs und des tau-Proteins | 8 |
| 1.1.2.2 Struktur des löslichen tau-Proteins | 8 |
| 1.1.2.3 Pathologische Modifikationen des tau-Proteins | 10 |
| 1.1.2.4 Struktur von PHFs | 11 |
| 1.1.2.5 Mechanismus der Fibrillen-Entstehung | 12 |
| 1.2 Neurodegenerative Erkrankungen | 14 |
| 1.3 Protein-Qualitätskontrolle | 15 |
| 1.3.1 Chaperone | 15 |
| 1.3.2 Proteasen | 16 |
| 1.3.2 Ubiquitin-Proteasom-System | 17 |
| 1.4 Die HtrA-Familie | 18 |
| 1.4.1 <i>E. coli</i> HtrA Proteasen | 20 |
| 1.4.2 Humane HtrA Proteasen | 23 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 2.1 Material | 27 |
| 2.1.1 Bakterienstämme | 27 |
| 2.1.2 Nährmedien und Antibiotika | 27 |
| 2.1.2.1 Nährmedien | 27 |
| 2.1.2.2 Antibiotika | 27 |
| 2.1.3 Eukaryotische Zelllinien | 28 |
| 2.1.5 Puffer und Lösungen | 28 |
| 2.1.6 Antikörper | 32 |
| 2.1.6.1 Primärantikörper | 32 |
| 2.1.6.2 Sekundärantikörper | 32 |
| 2.1.7 Biochemikalien und Chemikalien | 33 |
| 2.1.7.1 Proteine und Enzyme | 33 |
| 2.1.7.2 Protein- und Nukleinsäurestandards | 33 |
| 2.1.7.3 Chemikalien | 34 |
| 2.1.8 Vektoren | 34 |
| 2.1.9 Plasmide | 35 |
| 2.1.10 Oligonukleotide | 36 |
| 2.1.11 Synthetische Peptide | 37 |
| 2.1.12 Komplettsysteme | 37 |
| 2.1.13 Verbrauchsmaterialien | 38 |
| 2.1.14 Geräte | 38 |
| 2.1.15 Computer-Software | 39 |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden | 40 |
| 2.2.1 DNA Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion | 40 |
| 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA | 41 |
| 2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 41 |
| 2.2.4 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren | 41 |
| 2.2.5 Ligation | 42 |
| 2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 42 |
| 2.2.7 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> | 42 |
| 2.2.8 Kultivierung und Lagerung von Bakterien | 43 |
| 2.2.9 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Mini- und Maximaßstab) | 43 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.10 | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA | 44 |
| 2.2.11 | DNA-Sequenzierung | 44 |
| 2.2.12 | RNA Isolierung aus humanen Zellen und Gehirngewebe | 44 |
| 2.2.13 | cDNA-Synthese | 45 |
| 2.2.14 | Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) | 45 |
| 2.2.15 | DNA Isolierung aus Gehirngewebe | 47 |
| 2.2.16 | Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) | 47 |
| 2.3 | Proteinbiochemische Methoden | 48 |
| 2.3.1 | Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> | 48 |
| 2.3.2 | Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen | 49 |
| 2.3.3 | Reinigung von His-HtrA1 aus <i>E. coli</i> BL21 (D3 plus) Rosetta | 49 |
| 2.3.4 | Reinigung von tau-Proteinen aus <i>E. coli</i> BL21 (D3 plus) Rosetta | 50 |
| 2.3.5 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 51 |
| 2.3.6 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 51 |
| 2.3.7 | Coomassie-Blau Färbung | 52 |
| 2.3.8 | Western-Blot | 52 |
| 2.3.9 | Spaltung von pNA-Substraten durch HtrA1 | 53 |
| 2.3.10 | Abbau von tau durch HtrA1 | 54 |
| 2.3.11 | Tau Cross-Link und anschließender Abbau durch HtrA1 | 54 |
| 2.3.12 | Abbau von PHFs durch HtrA1 | 55 |
| 2.3.13 | Extraktion von Proteinen aus Gehirngewebe | 55 |
| 2.3.14 | HtrA1-ELISA | 56 |
| 2.3.15 | A β 42/40-ELISA | 57 |
| 2.3.16 | Tau/TauP-369 ELISA | 57 |
| 2.4 | Zellbiologische Methoden | 58 |
| 2.4.1 | Kultivierung eukaryotischer Zellen | 58 |
| 2.4.2 | Auftauen von Zellen | 58 |
| 2.4.3 | Zellpassage | 59 |
| 2.4.4 | Bestimmung der Zellzahl | 59 |
| 2.4.5 | Kryokonservierung von Zellen | 59 |
| 2.4.6 | Transfektion von Säugerzellen mit Jet-Pei [™] | 60 |
| 2.4.7 | Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen | 60 |
| 2.4.8 | Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie | 61 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.4.9 | Behandlung von Zellen mit tau-Proteinen | 62 |
| 2.4.10 | Lentivirale Transduktion von eukaryotischen Zellen | 62 |
| 2.4.11 | Retrovirale Transduktion von eukaryotischen Zellen | 63 |
| 2.4.12 | Selektion | 64 |
| 3. | ERGEBNISSE | 65 |
| 3.1 | Ist HtrA1 eine tau Protease? | 65 |
| 3.1.1 | Reinigung von HtrA1 | 65 |
| 3.1.2 | Reinigung von tau | 67 |
| 3.1.3 | Das tau-Protein wird von HtrA1 proteolytisch abgebaut | 68 |
| 3.1.3.1 | Verdau von tau durch HtrA1 | 68 |
| 3.1.3.2 | Bestimmung der HtrA1 Schnittstellen innerhalb des tau-Proteins | 71 |
| 3.1.3.3 | Durch Formaldehyd quervernetzte tau-Aggregate werden von HtrA1 abgebaut | 74 |
| 3.1.3.4 | Analyse von mit Formaldehyd behandelten tau-Fragmenten | 76 |
| 3.1.3.5 | Abbau von gepaarten helikalen Filamenten durch HtrA1 | 77 |
| 3.1.4 | Etablierung eines quantifizierbaren Enzymtests | 78 |
| 3.1.4.1 | Identifikation von synthetischen HtrA1-Substraten | 79 |
| 3.1.4.2 | Inhibierung der proteolytischen Aktivität von HtrA1 | 81 |
| 3.1.5 | Zellbiologische Analysen von HtrA1 und tau | 83 |
| 3.1.5.1 | Der Effekt der HtrA1 Suppression auf wt-tau und PHP-tau überexprimierende PC12 Zelllinien | 83 |
| 3.1.5.2 | Der Effekt der Überexpression von HtrA1 auf die wt-tau und PHP-tau- Proteinmenge in PC12 Zelllinien | 84 |
| 3.1.5.3 | Die Regulation der Expression von HtrA1 in tau überexprimierenden PC12 Zellen | 86 |
| 3.1.5.4 | HtrA1-Proteinmenge im Zellkulturüberstand von Zellen nach tau- Behandlung | 87 |
| 3.1.5.5 | HtrA1-RNA-Expression in U373-MG Zellen nach tau-Behandlung | 91 |
| 3.1.6 | Lokalisation von HtrA1-Cherry Konstrukten in U373-MG Zellen | 92 |
| 3.1.6.1 | Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry | 93 |
| 3.1.6.2 | Koexpressionsstudien von Δ ssHtrA1SA-Cherry und tau-GFP in U373-MG Zellen | 96 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.6.3 Lokalisation von Δ mac25HtrA1SA-, Δ ss Δ PDZHtrA1SA- und PDZ-Cherry | 98 |
| 3.1.7 Untersuchungen der HtrA1- und der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 99 |
| 3.1.7.1 HtrA1-RNA-Expression in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 100 |
| 3.1.7.2 HtrA1-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 101 |
| 3.1.7.3 Korrelation zwischen der HtrA1- und der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 102 |
| 3.1.7.4 Korrelation zwischen der HtrA1- und der tau-P396-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 104 |
| 3.2 Bedeutung des <i>HTRA1</i> Promotor Polymorphismus bei AD | 106 |
| 3.2.1 Nachweis des SNP rs11200638 im <i>HTRA1</i> -Promotor | 106 |
| 3.2.2 Effekt des SNP rs11200638 auf die HtrA1-RNA-Expression | 108 |
| 3.2.3 Effekt des SNP rs11200638 auf die HtrA1-Proteinmenge | 109 |
| 3.3 Der Einfluss der HtrA1-Proteinmenge auf die Anreicherung des Aβ-Peptids in Gehirngewebe | 111 |
| 3.3.1 Korrelation zwischen der HtrA1-Proteinmenge und der A β ₄₂ -Peptidmenge in humanen Gehirngewebe | 111 |
| 3.3.2 Korrelation zwischen der HtrA1-Proteinmenge und der A β ₄₀ -Peptidmenge in humanen Gehirngewebe | 113 |
| 3.3.3 Effekt eines HtrA1 <i>knockouts</i> in tg2576 Mäusen | 115 |
| 3.3.4 Anreicherung der A β -Peptidmenge in tg2576 x HtrA1 <i>knockout</i> Mäusen und in tg2576 Mäusen | 117 |
| 4. DISKUSSION | 119 |
| 4.1 HtrA1 ist eine tau Protease | 119 |
| 4.2 Synthetische Substrate und Inhibitoren für HtrA1 | 123 |
| 4.3 HtrA1 ist eine intrazelluläre tau Protease | 124 |
| 4.4 Tau induzierte eine bisher unbekannte Stressantwort | 125 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.5 | Untersuchung der subzellulären Lokalisation von HtrA1 und tau | 127 |
| 4.6 | Die Auswirkungen einer erhöhten HtrA1-Proteinmenge auf die Anreicherung des tau-Proteins in Gehirngewebe | 129 |
| 4.7 | Die Rolle des <i>HTRA1</i> Promotor SNPs rs11200639 bei AD | 132 |
| 4.8 | Die Auswirkungen einer erhöhten HtrA1-Proteinmenge auf die Anreicherung des Aβ-Peptids in Gehirngewebe | 134 |
| 4.9 | Ausblick: Identifizierung von geeigneten HtrA1-Aktivatoren und weiterführende Charakterisierung der Protease | 137 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 140 |
| 6. | LITERATUR | 142 |
| | DANKSAGUNG | 160 |
| | LEBENS LAUF | 161 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 1. 1 | Schematische Darstellung von Amyloiden-Plaques und Fibrillen | 2 |
| Abb. 1. 2 | Schematische Darstellung der nicht-amyloidogenen und amyloidogenen APP | 4 |
| Abb. 1. 3 | Schematische Darstellung der NFT Entstehung | 7 |
| Abb. 1. 4 | Schematische Darstellung des humanen <i>TAU</i> -Gens und der sechs tau-Isoformen | 9 |
| Abb. 1. 5 | Modell der <i>cross-β</i> Struktur der <i>Repeat</i> -Sequenz innerhalb der PHFs | 12 |
| Abb. 1. 6 | Domänen der HtrA-Familienmitglieder | 18 |
| Abb. 1. 7 | Die Kristallstruktur von <i>E. coli</i> DegP | 22 |
| Abb. 3. 1 | Überproduktion und Reinigung von HtrA1 aus <i>E. coli</i> | 66 |
| Abb. 3. 2 | Schematische Darstellung des PHP-tau-Proteins | 67 |
| Abb. 3. 3 | Überproduktion und Reinigung von wt-tau aus <i>E. coli</i> | 68 |
| Abb. 3. 4 | Abbau von wt-tau, PHP-tau oder Ala-tau durch HtrA1 mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 | 69 |
| Abb. 3. 5 | Abbau von wt-tau, PHP-tau oder Ala-tau durch HtrA1 mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 50:1 | 70 |
| Abb. 3. 6 | Übersicht der durch HtrA1 entstandenen Schnittstellen innerhalb der tau-Sequenzen | 72 |
| Abb. 3. 7 | Profil des Komplettverdaus von PHP-tau durch HtrA1 | 73 |
| Abb. 3. 8 | Aggregation des tau-Proteins mittels Cross-Link und anschließender Abbau durch HtrA1 | 75 |
| Abb. 3. 9 | Behandlung von tau-Fragmenten und nativen tau-Protein mit 1%, 0,1% und 0,01% Formaldehyd | 76 |
| Abb. 3. 10 | Analyse des PHFs Abbaus durch HtrA1 | 78 |
| Abb. 3. 11 | Bestimmung der spezifischen Aktivität für unterschiedliche pNA-Substrate | 79 |
| Abb. 3. 12 | Lokalisation der tau-4- und tau-5-Sequenz innerhalb der Tubulin-Bindenden-Region des tau-Proteins | 80 |
| Abb. 3. 13 | Konzentrationsreihe des DPMFKLV-Boronsäure Inhibitors im Enzymtest | 82 |
| Abb. 3. 14 | Western-Blot-Analyse der stabil mit HtrA1 transduzierten wt-tau und PHP-tau PC12 Zelllinien | 84 |
| Abb. 3. 15 | Effekt einer HtrA1 Überproduktion in wt-tau und PHP-tau PC12 Zelllinien | 85 |
| Abb. 3. 16 | HtrA1-RNA-Expression in tau überexprimierenden PC12 Zelllinien | 86 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 3. 17 Die Zugabe von wt-tau zum Zellkulturüberstand verschiedener Zelllinien führt zu einem deutlichen Anstieg der HtrA1-Proteinmenge | 88 |
| Abb. 3. 18 Zeitabhängiger Anstieg der HtrA1-Proteinmenge in tau-behandelten Zelllinien | 89 |
| Abb. 3. 19 Die Zugabe von PHP-tau zum Zellkulturüberstand von U373-MG Zellen führt zu einem deutlichen Anstieg der HtrA1-Proteinmenge | 90 |
| Abb. 3. 20 Untersuchung der HtrA1-RNA-Expression in tau-behandelten U373-MG Zellen | 91 |
| Abb. 3. 21 Schematische Darstellung der HtrA1-Cherry Konstrukte | 92 |
| Abb. 3. 22 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry in U373-MG Zellen | 93 |
| Abb. 3. 23 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry in Tubulin angefärbten U373-MG Zellen | 94 |
| Abb. 3. 24 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry in Aktin angefärbten U373-MG Zellen | 95 |
| Abb. 3. 25 Kolokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry und tau-GFP in U373-MG Zellen | 97 |
| Abb. 3. 26 Expression von Δ mac25HtrA1SA-Cherry, Δ ss Δ PDZHtrA1SA-Cherry und PDZ-Cherry in U373-MG Zellen | 98 |
| Abb. 3. 27 Expressionsanalyse von HtrA1 in Gehirngewebe | 100 |
| Abb. 3. 28 Quantitative Bestimmung der HtrA1-Proteinmenge in Gehirngewebe | 101 |
| Abb. 3. 29 Quantifizierung der HtrA1- und der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 103 |
| Abb. 3. 30 Quantifizierung der HtrA1- und der tau-P396-Proteinmengen in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 105 |
| Abb. 3. 31 Schematische Darstellung des SNPs im HtrA1-PCR-Produkt | 107 |
| Abb. 3. 32 Bestimmung des Genotyps der Patienten mittels RFLP-Analyse | 107 |
| Abb. 3. 33 Einfluss des SNPs auf die HtrA1-RNA-Expression in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 109 |
| Abb. 3. 34 Einfluss des SNPs auf die HtrA1-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 110 |
| Abb. 3. 35 Korrelationsstudie der HtrA1- und A β ₄₂ -Peptidmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 112 |
| Abb. 3. 36 Korrelationsstudie der HtrA1- und A β ₄₀ -Peptidmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen | 114 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 3. 37 Quantitativer Nachweis der A β ₄₂ - und A β ₄₀ -Peptidmenge in Gehirngewebe von AD ⁺ /HtrA1 ⁺ und AD ⁺ /HtrA1 ⁻ Mäusen | 116 |
| Abb. 3. 38 Altersbedingte Anreicherung der A β ₄₂ - und A β ₄₀ -Peptide in Gehirngewebe von AD ⁺ /HtrA1 ⁻ und AD ⁺ /HtrA1 ⁺ Mäusen | 117 |
| Abb. 4. 1 Modell des Abbaus von tau durch HtrA1 | 130 |
| Abb. 4. 2 Modell des Abbaus von APP und seinen Fragmenten durch HtrA1 | 135 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tab. 2. 1 Verwendete Bakterienstämme | 27 |
| Tab. 2. 2 Verwendete eukaryotische Zelllinien | 28 |
| Tab. 2. 3 Verwendete Primärantikörper | 32 |
| Tab. 2. 4 Verwendete Sekundärantikörper | 32 |
| Tab. 2. 5 Verwendete Vektoren | 34 |
| Tab. 2. 6 Verwendete Plasmide | 35 |
| Tab. 2. 7 Verwendete Oligonukleotide | 36 |
| Tab. 2. 8 Verwendete synthetische Peptide | 37 |
| Tab. 2. 9 Zusammenstellung von Sammel- und Trenngel | 52 |
| Tab. 2. 10 Kulturbedingungen verschiedener Zelllinien | 58 |
| Tab. 2. 11 Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen | 61 |
| Tab. 2. 12 Selektionsbedingungen für transduzierte PC12 Zellen | 64 |
| Tab. 3. 1 Michaelis-Menten-Analyse der pNA-Substrate | 81 |
| Tab. 3. 2 Genotyp-Bestimmung bei AD Patienten und Kontrollen | 108 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| A ₂₆₀ | Absorption bei 260 nm |
| A ₂₈₀ | Absorption bei 280 nm |
| A ₄₀₅ | Absorption bei 405 nm |
| Abb. | Abbildung |
| ACE | <i>Angiotensin-Converting Enzym</i> |
| AD | Alzheimersche Krankheit |
| ADAM | <i>a Disintegrin and Metalloprotease</i> |
| AICD | APP intrazelluläre Domäne |
| Ala | Alanin |
| AMD | altersbedingter Makuladegeneration |
| amp | Ampicillin |
| AP2 α | <i>Adaptor-Related Protein Complex 2α</i> |
| aph-1 | <i>Anterior pharynx defective</i> |
| APLP1 und APLP2 | <i>Amyloid Precursor Like Protein 1 und 2</i> |
| APP | <i>Amyloid Precursor Protein</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| As | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| A β | Amyloid-Beta |
| BACE | <i>β-APP Cleaving Enzyme</i> |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| CDK5 | <i>Cyclin-Dependent Kinase 5</i> |
| cm | Zentimeter |
| CMK | Chloromethylketon |
| ΔA_{405} | Absorptionsänderung bei 405 nm |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat |

| | |
|------------------|---|
| DTT | Dithiothreitol |
| ECE | <i>Endothelin-Converting Enzym</i> |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FPLC | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> |
| FTDP-17 | Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 |
| g | Gramm |
| GSK-3 β | <i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i> |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| His | Histidin |
| HPS | Hydroxyapatitsäule |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| Htr | <i>High temperature requirement protein</i> |
| HTS | <i>High Throughput Screen</i> |
| IC ₅₀ | Konzentration der 50%igen Inhibierung |
| IDE | <i>Insulin Degrading Enzym</i> |
| IGF | <i>Insulin-like Growth Factor</i> |
| IGFBP | <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid |
| k | Kilo |
| kan | Kanamycin |
| kDa | Kilodalton |
| K _m | Substrataffinität |
| λ | Lambda |
| l | Liter |
| LB | <i>Luria Bertani</i> |
| LOAD | sporadische AD Fälle mit spätem Erkrankungsbeginn |
| m | Milli (10 ⁻³) |
| Maldi-TOF | Massenspektrometrie |
| MalS | α -Amylase |
| MAP | Mikrotubuli-assoziierte Proteine |
| MAPK | <i>Mitogen Activated Kinase</i> |
| MARK | <i>Microtubule Affinity Regulating Kinase</i> |
| MBP | Maltose-Bindeprotein |

| | |
|---------|---|
| MDa | Megadalton |
| mg | Milligramm |
| μ | Mikro (10^{-6}) |
| μg | Mikrogramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| μM | Mikromolar |
| n | Nano (10^{-9}) |
| NBT | 4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid |
| NEP | Neprilysin |
| NFT | neurofibrilläre Bündel |
| Ni-NTA | Affinitätschromatographie |
| nM | Nanomolar |
| nm | Nanometer |
| NZA | NZ-Amine |
| OD | optische Dichte |
| OMP | Außenmembranprotein |
| o/n | über Nacht |
| % | Prozent |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pen-2 | <i>Presenilin enhancer</i> |
| RFLP | Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus |
| PHF | gepaarte helikale Filamenten |
| PhoA | Alkalische Phosphatase |
| PHP | Pseudohyperphosphoryliert |
| PKA | <i>Protein Kinase A</i> |
| PLAU | <i>Plasminogen Activator Urokinase</i> |
| pNA | p-Nitroanilin |
| PS | Presenilin |
| PSA | <i>Puromycin-Sensitive Aminopeptidase</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qRT-PCR | quantitative Real-Time PCR |

| | |
|------------------|--|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SADK | <i>Synapses of Amphids Defective family Kinases</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese |
| SFK | <i>Src family Kinases</i> |
| SNP | einzelner Nukleotid Polymorphismus |
| SRF | <i>Serum Response Factor</i> |
| SS | Signalsequenz |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris gepufferte Salzlösung |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor-β</i> |
| TreF | TrehalaseF |
| s | Sekunde |
| U | Unit |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| V _{max} | maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| v/v | Volumenprozent |
| W | Watt |
| w/v | Gewichtsprozent |
| wt | Wildtyp |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1. Einleitung

„Die Krankheit des Vergessens“

Mit diesen Worten beschrieb der Arzt Alois Alzheimer im Jahr 1901 den ersten Fall dessen, was später als Alzheimersche Krankheit (*Alzheimer's disease*, AD) bekannt wurde. Bei AD handelt es sich um eine Form der Altersdemenz, die am häufigsten bei Personen über 65 Lebensjahren auftritt (Alzheimer, 1907). In Deutschland leiden mehr als eine Millionen Menschen an Demenz, davon sind 700.000 Menschen an AD erkrankt. Im Jahre 2008 waren weltweit 29 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen. Da die Menschen in den westlichen Ländern eher älter werden vermutet man, dass die Zahl der Erkrankten weiter steigen wird.

Die Pathogenese von AD gliedert sich in drei Phasen. Während der ersten Phase treten Verluste des Kurzzeitgedächtnisses und Wortfindungsstörungen auf (Haupt *et al.*, 1991). In der zweiten Phase verstärken sich die Sprachprobleme, zusätzlich kommt es zum Verlust des abstrakten Denkens und starke Verhaltensstörungen treten auf, welche mit zeitlicher und räumlicher Desorientierung verbunden sind (Gilleard *et al.*, 1993; Kurz, 1997). Die dritte Phase kennzeichnet sich durch den vollständigen Verlust der Sprache, des Gedächtnisses und der Körperkontrolle. Die verschiedenen Phasen sind auf das fortschreitende Absterben von Neuronen in spezifischen Gehirnarealen zurückzuführen (Kurz, 1997). Die progressive Neurodegeneration findet besonders in den Gehirnarealen des Hippocampus, des Kortex, des basalen Vorderhirns und der Amygdala statt und ist bedingt durch toxische Proteinablagerungen (Patil *et al.*, 2008). Diese Proteinablagerungen treten bereits viele Jahre vor den ersten klinischen Symptomen auf und bestehen aus dem Amyloid-Beta (A β) Peptid oder dem hyperphosphorylierten tau-Protein (Hardy und Selkoe, 2002; Iqbal *et al.*, 2005). Die Ablagerungen sind für den Verlust von Synapsen, den Verlust der neuronalen Funktion und letztendlich für die Neurodegeneration verantwortlich (Avila, 2006). Andere Mechanismen, die bei der Pathologie von AD eine Rolle spielen, sind oxidativer Stress, Entzündungsreaktionen und eine veränderte Cholesterin-Homöostase. Bis heute sind die genauen Ursachen von AD jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Da im Rahmen dieser Arbeit der Abbau des A β -Peptids und insbesondere der Abbau des tau-Proteins untersucht wurde, soll im Folgenden näher auf diese beiden Proteine und ihre Ablagerungen eingegangen werden.

1.1 Protein-Ablagerungen in AD

Es werden zwei Arten von Protein-Ablagerungen in AD unterschieden: die extrazellulären β -Amyloid-Plaques und die intrazellulären neurofibrillären Bündel. Die extrazellulären Amyloid-Plaques bestehen hauptsächlich aus dem A β -Peptid. Der Hauptbestandteil der intrazellulären neurofibrillären Bündel ist das tau-Protein (Abb. 1. 1).

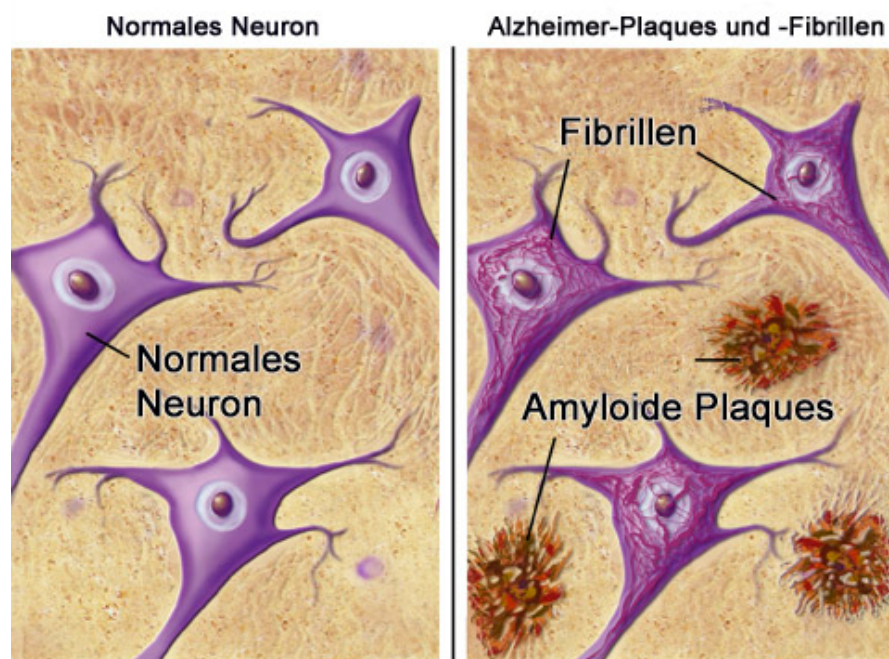


Abb. 1. 1 Schematische Darstellung von Amyloiden-Plaques und Fibrillen

Dargestellt sind extrazelluläre Plaques, die aus dem A β -Peptid bestehen und intrazelluläre Fibrillen, die aus dem hyperphosphorylierten tau-Protein bestehen. Diese Ablagerungen sind verantwortlich für den Funktionsverlust und den anschließenden Verlust von Neuronen in den Gehirnen von AD Patienten (entnommen aus <http://www.alzheimer-forschung.de>).

1.1.1 Die β -Amyloiden-Plaques

Die β -amyloiden-Plaques bestehen aus dem A β -Peptid, welches durch die proteolytische Spaltung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) entsteht (Selkoe, 1998). APP ist ein Membranprotein, welches im ER synthetisiert und anschließend über den zentralen sekretorischen Vesikelverkehr der Zelle an die Plasmamembran transportiert wird. Die proteolytische Spaltung des APP erfolgt durch die α - oder β -Sekretase und die anschließende Spaltung erfolgt durch die γ -Sekretase. Die Prozessierung findet

wahrscheinlich sowohl während des sekretorischen Vesikelverkehrs, als auch in endosomalen Kompartimenten nach erneuter Endozytose statt (Morishima-Kawashima und Ihara, 2002). Die Ursachen für die im Alter vermehrte Produktion und anschließende Ablagerung des A β -Peptids im Gehirn sind nur ansatzweise verstanden.

1.1.1.1 Die Struktur des APP und seine physiologische Bedeutung

Das *APP*-Gen ist auf dem Chromosom 21 an Position 21q21 lokalisiert (St George-Hyslop *et al.*, 1987). Es sind drei APP-Isoformen bekannt, die eine Länge von 695, 751 oder 770 Aminosäuren (As) haben und den Proteinen APP, *Amyloid Precursor Like Protein 1* und 2 (APLP1 und APLP2) entsprechen (Sandbrink *et al.*, 1994; Selkoe, 1994).

APLP1 und APLP2 sind ubiquitär in fast allen Zelltypen und Geweben exprimiert (Selkoe *et al.*, 1988; Wasco *et al.*, 1992; Slunt *et al.*, 1994). Im Vergleich zum APP fehlt ihnen eine Domäne, welche das A β -Peptid enthält. Deshalb spielen sie bei AD keine Rolle. APP gehört zu den Typ I Transmembranproteinen. Das Protein besteht aus einer N-terminalen Ektodomäne, einem Transmembransegment und einer kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Domäne (Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). APP kommt hauptsächlich in neuronalen Zellen vor.

Die physiologische Bedeutung von APP konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, auch wenn dem APP eine Beteiligung an verschiedenen physiologischen Prozessen zugesprochen wird (Selkoe, 1994; Selkoe, 1999). Hierzu zählen unter anderem die Regulation der Blutgerinnung, Inhibierung von Proteasen, Förderung der Zelladhäsion und dem Zellwachstum bis hin zur Neuroprotektion (Selkoe, 1991). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass APP eine Rolle beim axonalen Transport in Neuronen spielt (Koo *et al.*, 1990; Schubert *et al.*, 1991). Von Müller und Kins konnte eine *knockout* Maus hergestellt werden, die in allen drei APP/APLP Familienmitgliedern defizient war. Diese Mäuse wiesen Gehirnabnormalitäten, neuronale Migrationsdefizite und eine frühe Letalität auf (Müller und Kins, 2002).

1.1.1.2 Die nicht-amyloidogene und amyloidogene APP-Prozessierung

In der Zelle wird der größte Teil des APP von der α -Sekretase geschnitten, dies entspricht der nicht-amyloidogenen Prozessierung. Die α -Sekretase schneidet APP innerhalb der A β Region. Dieser Schnitt verhindert die A β Entstehung, stattdessen wird das lösliche APP- α (*soluble*, sAPP- α) freigesetzt. Der restliche C-Terminus mit einer Länge von 83 As wird anschließend von der γ -Sekretase geschnitten, wodurch das p3 Fragment und die APP intrazelluläre Domäne (*Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain*, AICD) entstehen (Abb. 1. 2 A) (Selkoe, 1991; Turner *et al.*, 2003).

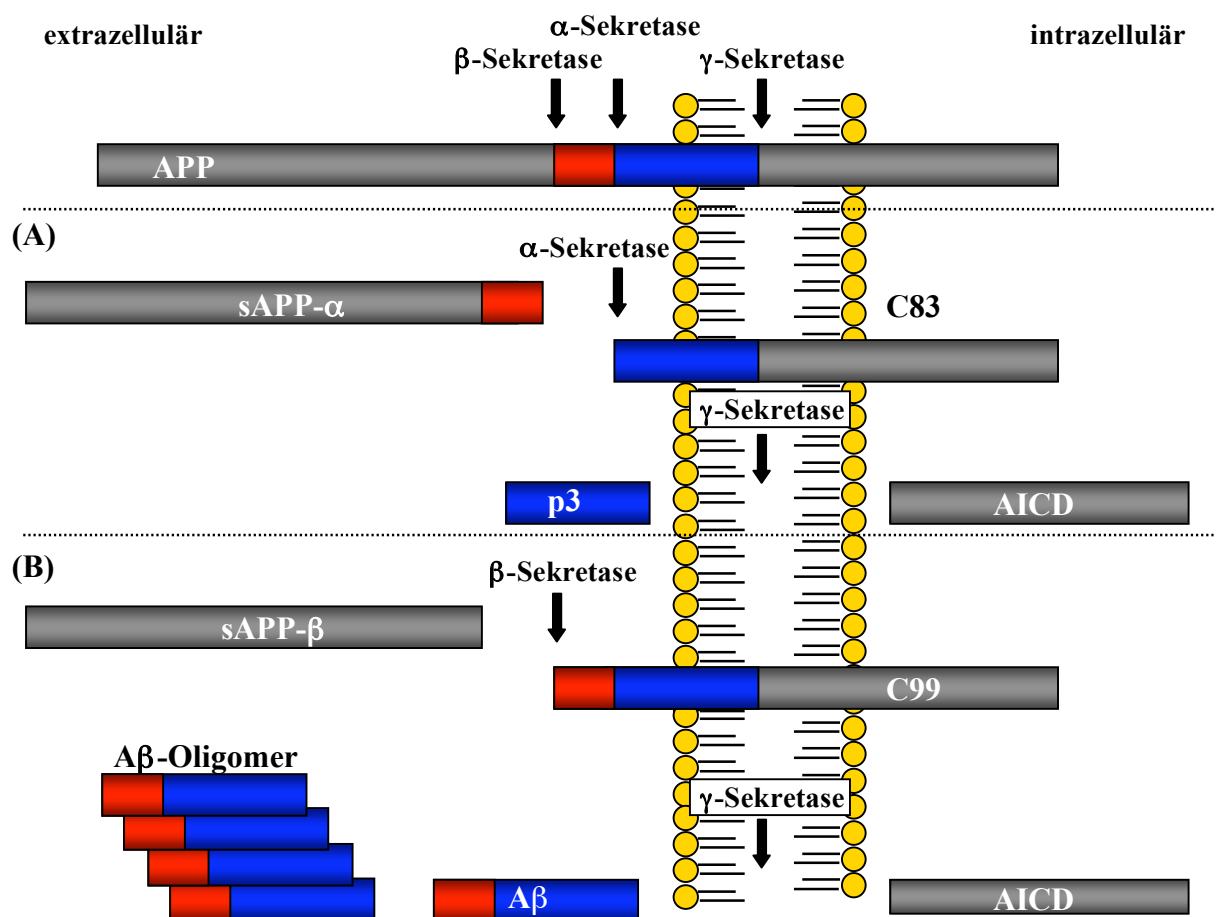


Abb. 1. 2 Schematische Darstellung der nicht-amyloidogenen und amyloidogenen APP Prozessierung

Das APP kann von der α -Sekretase oder der β -Sekretase geschnitten werden. Erst wenn der erste Schnitt durchgeführt wurde, kann die γ -Sekretase schneiden. Schneidet die α -Sekretase, so entsteht ein lösliches sAPP- α Fragment (grau und rot) und ein Membran verankertes C83 Fragment (blau und grau). Anschließend schneidet die γ -Sekretase das C83 Fragment: es entstehen das extrazelluläre, nicht-amyloidogene p3 Fragment und das intrazelluläre AICD (A). Wird der erste Schnitt der APP Prozessierung von der β -Sekretase durchgeführt so entsteht das lösliche sAPP- β

Fragment (grau) extrazellulär und das C99 Fragment (rot, blau und grau) bleibt in der Membran verankert. Anschließend schneidet die γ -Sekretase das C99 Fragment, es entstehen das extrazelluläre A β Fragment und das intrazelluläre AICD (B). Das A β -Peptid besitzt amyloidogene Eigenschaften und kann sich zu toxischen Oligomeren und höheren Strukturen zusammenlagern.

Die α -Sekretase ist ein Mitglied der ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) Proteinfamilie, welche zu den Typ-I Membranproteinen gehören. Mindestens drei Mitglieder der Familie sind in der Lage das APP an der α -Sekretase-Seite zu prozessieren: ADAM-9, ADAM-10 und ADAM-17 (Asai *et al.*, 2003).

Die amyloidogene APP-Prozessierung ist von zentraler Bedeutung für AD. Dabei wird das APP zuerst von der β -Sekretase und anschließend von der γ -Sekretase geschnitten. Die β -Sekretase schneidet APP, so dass das lösliche APP- β (*soluble*, sAPP- β) freigesetzt wird und ein 99 As langes C-terminales Fragment in der Membran verankert bleibt. Die β -Sekretase wird auch als *β -APP cleaving enzyme* (BACE) bezeichnet und gehört zu der Gruppe der membrangebundenen Aspartatproteasen (Vassar *et al.*, 1999; Esler und Wolfe, 2001). BACE liegt als glykosyliertes Monomer vor (Huse *et al.*, 2000).

Der 99 As lange C-Terminus von APP wird anschließend von der γ -Sekretase geschnitten, dabei entsteht das extrazelluläre A β -Fragment und das intrazelluläre AICD (Abb. 1. 2 B). Je nachdem an welcher Position die γ -Sekretase schneidet, entsteht das A β_{42} oder das A β_{40} Fragment (Wolfe, 2007).

Die γ -Sekretase ist sowohl an der nicht-amyloidogenen als auch an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligt. Das Substrat der Protease ist der C-Terminus des APP Fragments, welches membrangebunden vorliegt. Erst wenn das native APP durch die α - oder β -Sekretase prozessiert wurde, kann es durch die γ -Sekretase geschnitten werden. Die γ -Sekretase setzt sich aus mindestens vier Proteinen zusammen. Dieser Komplex ist in die Membran der Zelle integriert und durchspannt sie mit mehreren transmembranen Segmenten. Eine weitere Besonderheit der Protease ist, dass sie ihr Substrat innerhalb der Membran schneidet (Steiner und Haas, 2000; Wolfe, 2003; Haass, 2004).

Bei den vier Proteinen der γ -Sekretase handelt es sich um zwei Homologe des Presenilins (PS1 oder PS2), Nicastin, *Anterior pharynx defective* (aph-1) und *Presenilin enhancer* (pen-2). Der Komplex setzt sich aus je einem dieser vier Proteine zusammen (Edbauer *et al.*, 2003; Kimberly *et al.*, 2003; Fraering *et al.*, 2004).

1.1.1.3 Fehlfaltung, Aggregation und Anreicherung des A β -Peptids

Das Verständnis, wie es zu Fehlfaltung und anschließender Aggregation von A β kommt ist essentiell, um diesen Prozess zu verhindern und die Erkrankung zu heilen. Kommt es zu Zusammenlagerungen von A β Monomeren, ändert sich die Struktur. Es bilden sich β -Faltblatt Strukturen aus, die Protease resistent und toxisch für neuronale Zellen sind. Zunächst lagern sich die A β -Peptide zu Protofibrillen in der extrazellulären Matrix zusammen. Diese haben einen Durchmesser von 5 nm und eine Länge von 200 nm (Makin und Serpell, 2005). Anschließend lagern sich die Protofibrillen zu Fibrillen zusammen und diese bilden den Kern für β -Amyloid-Plaques bzw. senile Plaques (Sunde *et al.*, 1997; Walsh und Selkoe, 2004; Makin und Serpell, 2005; Lesne *et al.*, 2006).

Die Aggregation von A β -Peptiden (A β_{42} und A β_{40}) zu einer geordneten hocholigomeren Struktur hängt maßgeblich von ihrer Umgebung ab, dabei sind folgende Bedingungen entscheidend: pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur, mechanische Bewegung und Interaktionen mit der Membranoberfläche und mit anderen Proteinen (Barghorn *et al.*, 2005).

In vitro lagern sich die löslichen A β Monomere (~4 kDa) schnell zu Multimeren zusammen. Die Stabilität dieser Multimere ist bei der Zusammenlagerung des A β_{42} -Peptids, im Vergleich zu den zusammengelagerten A β_{40} -Peptiden, deutlich höher (Bitan *et al.*, 2003). Dass es sich bei A β_{42} um die toxischere Variante handelt, kann durch die Tatsache unterstützt werden, dass fast alle familiären AD Mutationen zu einer Erhöhung von A β_{42} führen (Paivio *et al.*, 2004).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Abbau der A β -Peptide auf drei Mechanismen zurückzuführen ist: Proteolyse (Selkoe, 2001a), Transport über die Blut-Hirn-Schranke und Rezeptor-vermittelte Endozytose (Zlokovic, 2004). Bei dem späten Erkrankungsbeginn von AD (*late onset* AD, LOAD; Erkrankungsalter ≥ 65 Jahre) kommt es schließlich zu einem verminderten Abbau der A β -Peptide und demzufolge wird die Aggregation und Anreicherung des A β -Peptids begünstigt.

1.1.2 Die neurofibrillären Bündel

Die neurofibrillären Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFT) sind die zweite Form von Proteinablagerungen, die in Gehirngewebe von AD Patienten zu finden sind. Sie bestehen hauptsächlich aus dem hyperphosphorylierten tau-Protein.

Die zelluläre Funktion des tau-Proteins ist die Stabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes (Weingarten *et al.*, 1975). Kommt es zu Modifikationen des tau-Proteins beeinträchtigt dies die natürliche Bindung an die Mikrotubuli und das Protein löst sich vom Tubulin ab (Mandelkow und Mandelkow, 1998; siehe 1.2.2.3). Das zytoplasmatisch lokalisierte tau-Protein lagert sich zu tau-Filamenten zusammen, die aufgrund ihrer Struktur als gepaarte helikale Filamente (*paired helical filaments*, PHFs) bezeichnet werden (Kosik *et al.*, 1986; Friedhoff *et al.*, 2000). Diese PHFs bilden eine Art Kern für die höher strukturierten NFTs (Abb. 1.3). Letztendlich führen diese NFTs und die Destabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes zum Absterben der Nervenzellen (Brandt *et al.*, 2005).

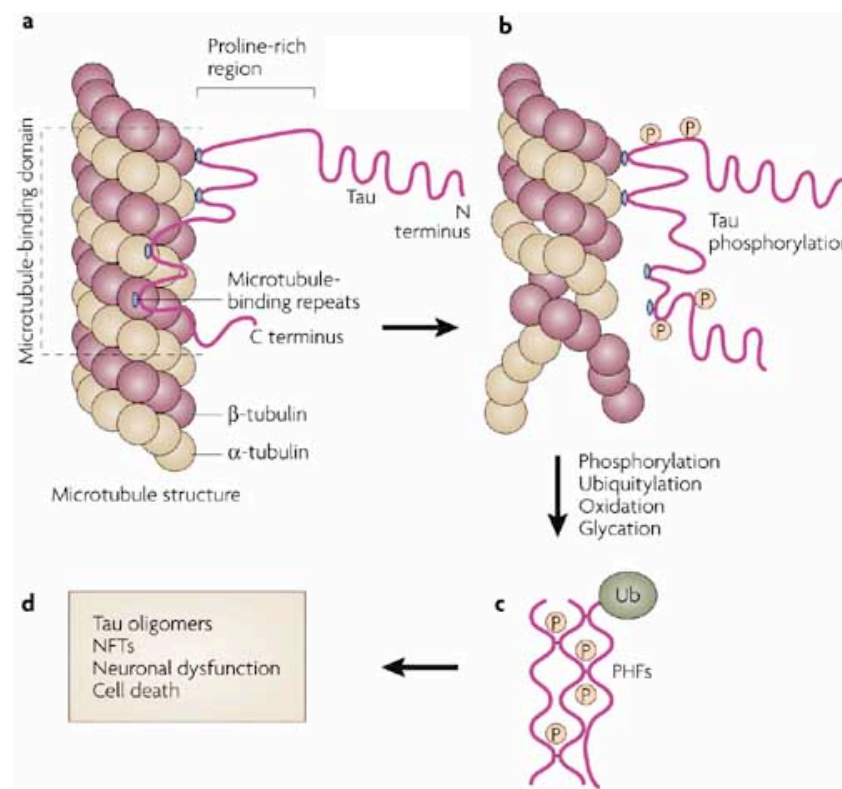


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der NFT Entstehung

Das tau-Protein ist über *Repeat*-Sequenzen an die Mikrotubuli-assoziiert (A). Kommt es zu einer Phosphorylierung des tau-Proteins, dissoziiert es vom Tubulin. Dies hat eine Destabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes zur Folge (B). Weitere Modifikation des tau-Proteins folgen und mehrere tau-Proteine lagern sich zu β -Faltblatt strukturierten PHFs zusammen (C). Die PHFs bilden den Kern für die höher strukturierten NFTs, die letztendlich für den Zelltod verantwortlich sind (D) (modifiziert entnommen aus Mazanetz und Fischer, 2007).

1.1.2.1 Funktion des Mikrotubuli-Netzwerkes, der MAPs und des tau-Proteins

Das Mikrotubuli-Netzwerk ist eines der drei Bestandteile des Zytoskeletts einer Zelle, bei den zwei anderen handelt es sich um Aktin-Filamente und Intermediärfilamente. Die Mikrotubuli sind sehr dynamische Gebilde, die ständig depolymerisieren und polymerisieren. Sie sind für die Überlebensfähigkeit einer Zelle von großer Bedeutung. Die polymerisierten Mikrotubuli sind für die Stabilität der Zellmorphologie verantwortlich und gewährleisten den Transport von Organellen, Vesikeln und Protein-Komplexen in die Peripherie der Zelle. Mit Hilfe der Polymerisierung und Depolymerisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes können Zellmigration, Differenzierung und Zellteilung reguliert werden (Alberts *et al.*, 1997).

Die Dynamik des Mikrotubuli-Netzwerkes wird mit Hilfe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (*microtubule-associated proteins*, MAPs) reguliert. Durch MAPs kann der geordnete Aufbau bzw. der Abbau des Mikrotubuli-Netzwerkes reguliert werden (Hirokawa, 1993; Garcia und Cleveland, 2001).

Das tau-Protein gehört zu der Klasse der MAPs und wird hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert. Das Protein interagiert mit mehreren Untereinheiten des Mikrotubuli-Netzwerkes und trägt damit zur Stabilisierung bei. Die stabilisierende Wirkung von tau ist besonders in neuronalen Zellen von großer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von tau vor allem beim Wachstum von Axonen, der Etablierung der Zellpolarität und während der neuronalen Entwicklung stark hochreguliert ist (Drubin und Kirschner, 1986; Mukrasch *et al.*, 2005; Mukrasch *et al.*, 2007).

1.1.2.2 Struktur des löslichen tau-Proteins

Im menschlichen Zentralnervensystem (ZNS) gibt es sechs verschiedene tau-Isoformen, die auf einem Gen auf Chromosom 17 kodiert sind. Die Isoformen variieren in ihrer Länge zwischen 352 bis 441 Aa (Abb. 1. 4).

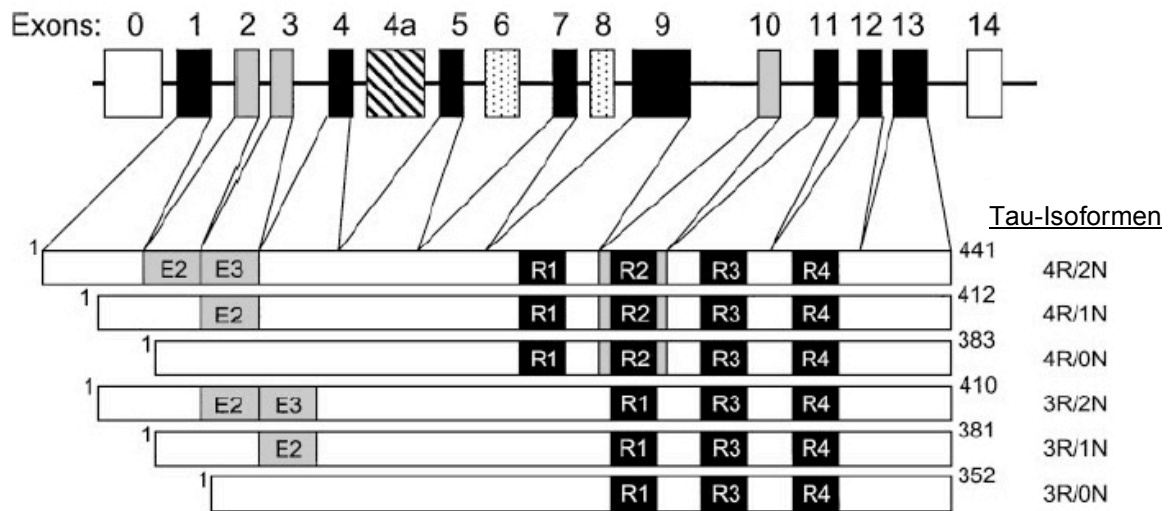


Abb. 1. 4 Schematische Darstellung des humanen *TAU*-Gens und der sechs tau-Isoformen die im ZNS vorkommen

Das humane *TAU*-Gen besteht aus 14 Exons (E) und dem Exon E0, welches ein Teil des Promotors ist. Durch alternatives Spleißen von E2, E3 und E10 (graue Box) entstehen sechs verschiedene tau-Isoformen im ZNS des Menschen. E6, E8 (gepunktete Boxen) und E4a (gestrichelte Box) werden, im humanen ZNS, nicht transkribiert. Die schwarzen Boxen, die in den Isoformen dargestellt sind, stellen die Mikrotubuli bindenden *Repeats* (R) dar, sie sind mit R1 bis R4 nummeriert (modifiziert entnommen aus Brandt *et al.*, 2005).

Der N-Terminus des tau-Proteins ist hydrophil. Daran schließt sich eine Prolinreiche-Region an. Der C-terminale Abschnitt enthält die Tubulin-Bindende-Region (~ 93 Aminosäuren), welche drei oder vier *Repeats* enthält. Diese *Repeats* bestehen aus 18 Aminosäuren und zeichnen sich durch ihre Proteaseresistenz und ihre Fähigkeit an Mikrotubuli zu binden aus (Gustke *et al.*, 1994). Zwischen dem zweiten *Repeat* und dem dritten *Repeat* befindet sich ein Hexapeptid (³⁰⁶VQIVYK³¹¹), welches ein hohes Potential besitzt β -Faltblatt Strukturen auszubilden. Es wird als *Self-Assembly-Region* bezeichnet (von Bergen *et al.*, 2000). Drei der Isoformen enthalten vier *Repeats*, während die Restlichen nur drei *Repeats* enthalten.

Das tau-Protein besitzt keine ausgeprägte Sekundärstruktur (Romero *et al.*, 2001). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bindung des tau-Proteins an Mikrotubuli zu einer Strukturierung des Proteins führt (Butner und Kirschner, 1991). Weiterführende NMR Studien der tau-Tubulin Interaktionen haben gezeigt, dass mehrere positiv geladene Aminosäuren, die in den *Repeats* und in der flankierenden Regionen lokalisiert sind, an Tubulin binden (Mukrasch *et al.*, 2005; Mukrasch *et al.*, 2007).

1.1.2.3 Pathologische Modifikationen des tau-Proteins

Mehrere Modifikationen wurden für das tau-Protein in den Gehirnen von AD Patienten beschrieben, welche die Bildung von PHFs begünstigen. Bei den Modifikationen handelt es sich um Hyperphosphorylierung, Ubiquitinylierung, Glykosylierung/Oxidierung und Degradation des tau-Proteins. Die Modifikationen werden im Einzelnen besprochen:

Der Grad der Phosphorylierung des tau-Proteins hat einen starken Einfluss auf die Bindung an Tubulin. So ist hyperphosphoryliertes tau-Protein nicht mehr in der Lage an Tubulin zu binden (Gustke *et al.*, 1992, Drewes *et al.*, 1995). Die Hyperphosphorylierung des Proteins wurde an mindestens 27 verschiedenen Phosphorylierungsstellen nachgewiesen, die meisten Stellen befinden sich vor oder hinter der Tubulin-Bindenden-Region (Trojanowski und Lee, 1995; Johnson und Hartigan, 1999; De Vrij *et al.*, 2004). Die Kinasen, die tau phosphorylieren werden, in drei Gruppen unterteilt. (i) Kinasen, die Serin- und Threonin-Reste vor und hinter der Tubulin-Bindenden-Region phosphorylieren: *Glycogen Synthase Kinase 3 β* (GSK-3 β) (Ishiguro *et al.*, 1993), *Cyclin-Dependent Kinase 5* (CDK5) (Baumann *et al.*, 1993) und *Mitogen Activated Kinase* (MAPK) (Drewes *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993). (ii) Kinasen, die das KXGS Motiv innerhalb der *Repeats* phosphorylieren: *Protein Kinase A* (PKA), *Microtubule Affinity Regulating Kinase* (MARK) (Drewes *et al.*, 1997) und *Synapses of Amphids Defective family Kinases* (SADK) (Kishi *et al.*, 2005). (iii) Kinasen, die Tyrosin-Reste im tau-Protein phosphorylieren: *SRc family Kinases* (SFK) (Lee *et al.*, 1998; Lee, 2005) und c-Abl (Derkinderen *et al.*, 2005).

Das monomere tau-Protein wird ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut. Das aggregierte tau-Protein innerhalb der PHFs ist ebenfalls an verschiedenen Stellen ubiquitinyliert, dies soll wahrscheinlich den Versuch darstellen das Protein über den Proteasom-Weg abzubauen (Mori *et al.*, 1987; Litersky und Johnson, 1995). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass tau-Aggregate einen inhibitorischen Effekt auf das Proteasom besitzen und PHFs nicht über das Proteasom abgebaut werden können (Keck *et al.*, 2003).

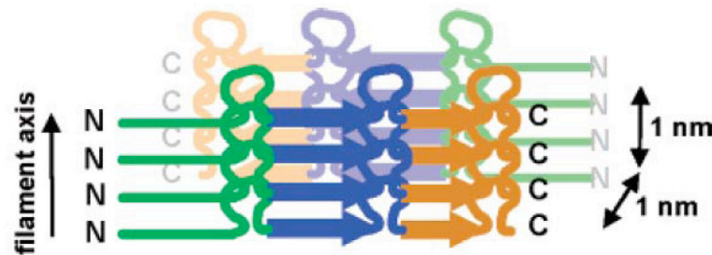
Die Glykosylierung, ebenso wie die Phosphorylierung, führt zu einer verminderten Tubulin Bindung und begünstigt damit die tau-Aggregation in Form von PHFs (Ledesma *et al.*, 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass glykosylierte PHFs in der Lage sind oxidativen Stress in der Zelle auszulösen, was letztendlich zur Schädigung der neuronalen Zellen führt (Yan *et al.*, 1994).

Die Degradation des tau-Proteins, zum Beispiel durch Mitglieder der Caspase Familie, (Gamblin *et al.*, 2003; Rissman *et al.*, 2004) führt zu der Entstehung von tau-Fragmenten. Verglichen mit dem nativen tau-Protein weisen diese Fragmente eine deutlich höhere Tendenz zur Aggregation auf. Es wird vermutet, dass die tau-Fragmente eine Art Kern darstellen, an dem sich weitere tau-Proteine anlagern können.

1.1.2.4 Struktur von PHFs

In den Gehirnen von AD Patienten löst sich das tau-Protein von dem Mikrotubuli-Netzwerk ab und aggregiert. Die zytoplasmatisch lokalisierte Tubulin-Bindende-Region des tau-Proteins bildet β -Faltblatt Strukturen aus. Die Übereinanderlagerung mehrerer β -Faltblatt Strukturen führt zu der Entstehung einer filamentartigen Struktur, den sogenannten PHFs. Die PHFs haben eine Breite von 10-20 nm und eine Länge von 80 nm (Crowther, 1991). Alle sechs Isoformen des Proteins, die im ZNS des Menschen vorkommen, sind in den PHFs vertreten. Die β -Faltblatt Strukturen laufen parallel und aufrecht zu der langen Achse des Filaments und machen den proteaseresistenten Kern jedes Filaments aus (Perry *et al.*, 1991; Berriman *et al.*, 2003; Margittai und Langen, 2004). Innerhalb der PHFs interagieren die β -Faltblatt Strukturen der Tubulin-Bindenden Region mit der Tubulin-Bindenden-Region eines anderen tau-Proteins, was als *cross- β* Struktur bezeichnet wird. Auch wenn die Anzahl der beteiligten *Repeats* in der *cross- β* Struktur variiert (je nachdem ob die Isoform drei oder vier *Repeats* enthält) reichen drei *Repeats* aus, um den proteaseresistenten Kern zu bilden (Abb. 1. 5) (Novak *et al.*, 1993). Die Regionen außerhalb des Kerns sind weniger strukturiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bereiche außerhalb der Tubulin-Bindenden-Region für die Stabilität der Filamente nicht entscheidend sind (Carmel *et al.*, 1996).

(A)



(B)

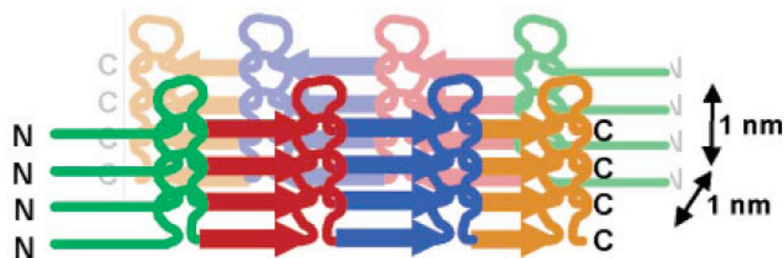


Abb. 1. 5 Modell der cross- β Struktur der Repeat-Sequenz innerhalb der PHFs

Aggregierte drei *Repeats* (A) und vier *Repeats* (B) wurden mit Hilfe der *Scanning Transmission Electron Microscopy* analysiert. Die unterschiedlichen *Repeats* sind farblich gezeigt (R1, R1, R3 und R4 in grün, rot, blau und orange). Das Filament ist vertikal zu der Ebene des Papiers dargestellt. Die Vorderseite stellt vier Moleküle dar, die *cross- β* Strukturen ausbilden. Die Hinterseite zeigt ebenfalls vier Moleküle, die *cross- β* Strukturen ausbilden (entnommen aus von Bergen *et al.*, 2006).

Die PHFs lagern sich intrazellulär zusammen und bilden die neurofibrillären Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFT). Wie bereits erwähnt führen die NFTs zum Absterben der Nervenzellen (Brandt *et al.*, 2005). Dies hat zur Folge, dass einige NFTs auch extrazellulär vorkommen, sie werden „*ghost tangles*“ oder extrazelluläre NFTs (eNFTs) genannt. Sie sind in der Lage kleine Moleküle zu binden, wie z.B. *Congo red*, was *cross- β* Strukturen nachweist (Schwab *et al.*, 1995). Welchen Einfluss die eNFTs auf die umgebenden Zellen haben, ist noch nicht geklärt.

1.1.2.5 Mechanismus der Fibrillen-Entstehung

Obwohl die Struktur des nativen tau-Proteins und der PHFs relativ gut charakterisiert wurden, ist der Weg, wie es zu der *cross- β* Struktur kommt, noch nicht richtig verstanden. Man geht davon aus, dass sich spontan eine Art Kern bildet. Dieser Kern besteht aus tau-Proteinen, die mit sich selbst interagieren. Jedoch haben Studien gezeigt, dass *in vitro*, in

der Zellkultur und in transgenen Mausmodellen dieser Weg kinetisch nicht favorisiert ist (Chirita und Kuret 2004). Die Aggregation von PHFs *in vitro* konnte jedoch durch die Zugabe von Cross-Linkern, wie Formaldehyd (Nie *et al.*, 2007a), Heparin (Goeder *et al.*, 1996), RNA (Kampers *et al.*, 1996) oder Arachidonsäure (Wilson und Binder, 1997) erreicht werden. Filamente, die durch *in vitro*-Aggregation entstanden sind, ähnelten dem Kern von PHFs, die aus AD Gehirnen gereinigt wurden (Wischik *et al.*, 1988; von Bergen *et al.*, 2006).

Das tau-Protein besitzt im Verhältnis zu anderen Proteinen eher eine geringe Anzahl an hydrophoben As. Innerhalb der Tubulin-Bindenden-Region ist die Anzahl der hydrophoben As jedoch deutlich erhöht. Deshalb aggregiert das native tau-Protein wesentlich langsamer als die Tubulin-Bindende-Region (Seitz *et al.*, 2002).

In der Literatur sind verschiedene Modelle veröffentlicht worden, die für die Entstehung des proteaseresistenten Kerns verantwortlich sein könnten: (i) Durch die proteolytische Prozessierung des tau-Proteins durch eine Caspase, könnte die Kinetik zugunsten der *cross*- β Struktur verschoben werden. Die Caspase schneidet das tau-Protein, so dass ein N-terminales und ein C-terminales Fragment (mit der Tubulin-Bindenden-Region) entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass der Schnitt der Caspase ein frühes Ereignis während AD darstellt und entscheidend für die Fibrillen-Pathologie ist (Rissman *et al.*, 2004). Die durch die Caspase produzierten C-terminalen Fragmente von tau könnten deshalb den Kern für die Entstehung der PHFs bilden. (ii) Durch die Phosphorylierung liegen die tau-Proteine gelöst im Zytoplasma vor und sind demzufolge eher in der Lage miteinander zu interagieren als wenn sie an Mikrotubuli gebunden sind (De Vrij *et al.*, 2004). (iii) Es konnte gezeigt werden, dass tau-Proteine in der Lage sind an der Innenseite der Zytoplasmamembran eine *cross*- β Struktur auszubilden (Galvan *et al.*, 2001). (iv) Andere Proteine könnten als Oberfläche dienen, an die sich das tau-Protein anlagert um eine *cross*- β Struktur auszubilden (Kuret *et al.*, 2005). Welche dieser Möglichkeiten maßgeblich für die Bildung von Fibrillen verantwortlich ist oder ob weitere Faktoren von Bedeutung sind ist noch nicht geklärt.

1.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Einige humane Erkrankungen sind auf die Aggregation von Proteinen zurückzuführen. Diese Erkrankungen werden in drei Gruppen eingeteilt (i) neurodegenerative; Aggregationen in Gehirngewebe, (ii) nicht neurodegenerative; Aggregationen in anderen Geweben als im Gehirn, (iii) nicht neurodegenerative systemisch; Aggregationen kommen gleichzeitig in verschiedenen Gewebetypen vor (Chiti und Dobson, 2006).

Proteine, die in neurodegenerativen Erkrankungen aggregieren haben gemein, dass sie eine nicht-pathogene und eine pathogene Struktur ausbilden können. Bei der Entstehung der pathogenen Struktur lagern sich die Proteine zusammen und bilden anschließend Fibrillen. Die Ausbildung dieser Fibrillen und die daraus resultierende Zerstörung von Neuronen steht im Mittelpunkt der jeweiligen Krankheit (Westmark *et al.*, 2005).

Die neurodegenerativen Erkrankungen unterscheiden sich hinsichtlich des aggregierten Proteins; so aggregieren z. B. bei AD das A β -Peptid und das tau-Protein, bei der Parkinsonschen Krankheit das α -Synuclein-Protein, bei Huntington-Chorea das Huntingtin-Protein und bei der Creutzfeld-Jakob-Krankheit das Prion-Protein. Die jeweiligen Krankheiten sind nicht nur aufgrund der fehlgefalteten Proteine unterscheidbar, sondern auch hinsichtlich der betroffenen Neuronen und der betroffenen Gehirnareale.

Einige neurodegenerative Erkrankungen haben gemeinsam, dass das normalerweise Mikrotubuli-assoziierte tau-Protein aggregiert. Diese Erkrankungen werden als Tauopathien zusammengefasst. Die tau-Aggregate kommen, je nachdem um welche Erkrankung es sich handelt, in unterschiedlichen Typen von Neuronen vor. Zu den Tauopathien zählen AD, *supranuclear palsy*, *corticobasal degeneration*, *Pick disease*, *frontotemporal dementia* und *parkinsonism linked to chromosome 17* (FTDP-17). Der Mechanismus der vom löslichen tau-Protein zu aggregiertem tau-Protein führt wurde intensiv untersucht (Lee *et al.*, 2001; Chirita und Kuret, 2004; Terwel *et al.*, 2005).

Der Abbau der Proteinaggregate ist demzufolge von zentraler Bedeutung für die Heilung der neurodegenerativen Erkrankungen.

1.3 Protein-Qualitätskontrolle

Die Protein-Qualitätskontrolle überwacht die Faltung neusynthetisierter Proteine in ihre nativen, dreidimensionalen Konformation und vermittelt entweder die Rückfaltung falschgefalteter Proteine oder deren Abbau. Zu den zentralen Komponenten gehören Chaperone, Proteasen und das Ubiquitin-Proteasom-System.

Die Protein-Qualitätskontrolle überwacht nicht nur die Neusynthese von Proteinen, sondern verhindert auch die Akkumulation faltungsdefekter Proteine. Die Tendenz von falsch gefalteten Proteinen zu aggregieren und mit anderen Proteinen zu interagieren, kann die Funktion einer Zelle nicht nur stören, sondern auch toxisch sein. Zunächst löst die Akkumulation von Proteinen, insbesondere von Proteinen die in neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen (A β , tau, α -Synuclein, Huntingtin-Protein und Prion-Protein), eine Stressantwort in der Zelle aus. Die Bildung von großen Proteinaggregaten tritt ein, wenn die Kapazität des proteolytischen Systems und der molekularen Chaperone, die Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen nicht mehr bewältigen kann (Prouty und Goldberg, 1972; Klemes *et al.*, 1981; Sherman und Goldberg, 2001). Im Laufe der Alterung, insbesondere während der AD Erkrankung, kann die Funktionen von zentralen Komponenten der Protein-Qualitätskontrolle ausgetriggert werden.

1.3.1 Chaperone

Die molekularen Chaperone schützen die Zelle vor fehlgefalteten oder ungefalteten Proteinen. Sie können fehlgefalteten Proteinen helfen sich richtig zu falten und können damit die Proteine vor dem Abbau durch Proteasen bewahren. Chaperone und Proteasen sind als Stressproteine entdeckt worden, da ihre Expression unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitzeschock, ansteigt. Deshalb gehören sie zu den Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*, HSPs) (Lindquist, 1986; Morimoto, 1998). Die HSPs schützen die Zellen vor erhöhten Temperaturen und erhöhten Salz- und Schwermetallkonzentrationen (Rosen und Ron, 2002). Kommt es zur Akkumulation von Proteinen werden HSPs ebenfalls überexprimiert. Die Überexpression von Chaperonen wie dem hsp70 führte dazu, dass nicht stabile Proteinaggregate entfernt werden können. Bei stabilen Proteinaggregaten ist die Funktion der Chaperone allerdings nicht mehr gewährleistet. Kreuzungen von transgenen Mäusen, die entweder A β , tau oder α -Synuclein überexprimierten, mit Mäusen

die das Chaperon-Protein hsp70 überexprimierten, führten deshalb zu keiner effizienten Verminderung der Proteinaggregatbildung (Chai *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2003; Giffard *et al.*, 2004; Klucken *et al.*, 2004; Magrane *et al.*, 2004).

1.3.2 Proteasen

Proteasen bauen fehlgefaltete Proteine ab. Wie es dazu kommt, dass ein Protein letztendlich durch Chaperone repariert oder durch Proteasen abgebaut wird ist noch nicht vollständig verstanden. Der Grad des Faltungsdefektes könnte allerdings ein wichtiges Kriterium sein.

Die Anreicherung von A β während AD hängt nicht nur von seiner Produktion ab, sondern auch von seinem Abbau. Es sind einige Proteasen in der Literatur beschrieben, die in der Lage sind das A β -Peptid abzubauen.

Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Deletion für das *Insulin Degrading Enzym* (IDE)-, das *Endothelin-Converting Enzym* (ECE)- oder Neprilysin (NEP)-Gen besitzen eine erhöhte Menge an zerebralem A β aufweisen. IDE degradiert hauptsächlich intrazelluläre lösliche und nicht-lösliche A β -Peptide (Farris *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 1998). NEP wird eine besondere Rolle in dem A β_{42} Abbau zugesprochen, diese Relevanz konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NEP eine schützende Wirkung für Neuronen besitzt (Carson und Turner 2002; Iwata *et al.*, 2001). Das *Angiotensin-Converting Enzym* (ACE) kann die A β -Aggregation durch die Hydrolyse von A β_{40} inhibieren. Allerdings konnten keine *in vivo* Daten gewonnen werden, welche die Bedeutung von ACE beim A β Abbau und der Inhibierung von Aggregaten bestätigten (Hu *et al.*, 2001). ECE kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* A β hydrolysieren (Eckman *et al.*, 2001). *Plasminogen Activator Urokinase* (PLAU) ist ein weiterer Regulator für die A β -Peptidmenge, besonders unter pathologischen Bedingungen (Tucker *et al.*, 2000). *High temperature requirement A1* (HtrA1) baut monomeres und oligomeres A β_{42} ab und ein spezifischer Inhibitor von HtrA1 führt zu einer Akkumulation von A β_{40} im Zellkulturüberstand von Astrozyten. Außerdem konnte eine Kolokalisation von HtrA1 und A β Ablagerungen in Gehirngewebe von AD Patienten nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte HtrA1 auch eine Kolokalisation zu NFTs (Grau *et al.*, 2005).

Zusätzlich können A β -Peptide neben Proteolyse auch durch den Transport über die Blut-Hirn-Schranke und Rezeptor-vermittelte Endozytose abgebaut werden (Zlokovic, 2004).

Es sind ebenfalls einige Proteasen bekannt, die das tau-Protein an verschiedenen Stellen prozessieren können. Allerdings konnte keine Protease identifiziert werden, die tau-Aggregate effizient abbauen kann. Die *Puromycin-Sensitive Aminopeptidase* (PSA) kann zwar monomeres, nicht-pathogenes tau-Protein abbauen, zeigt aber nur eine schwache Aktivität gegenüber löslichen tau-Proteinen oder PHFs, die aus dem Gehirngewebe von AD Patienten gereinigt wurden (Sengupta *et al.*, 2006). Der tau-Verdau durch Caspase produziert ein Fragment, welches eine höhere Toxizität und eine höhere Tendenz zur Aggregation aufweist als das native tau-Protein (Gamblin *et al.*, 2003b; Rissman *et al.*, 2004). Cathepsin D kann zwar phosphoryliertes tau-Protein schneiden, es entsteht aber ein Fragment mit einer intakten Tubulin-Bindenden-Region, welches PHFs formen kann. Calpain schneidet das monomere tau-Protein hochspezifisch. Calpain ist aber nicht in der Lage aggregiertes, hyperphosphoryliertes tau-Protein, wie es in den PHFs vorkommt, zu schneiden (Mercken *et al.*, 1995). Der tau Verdau durch Thrombin lässt ein 25 kDa Fragment entstehen, welches die Tubulin-Bindende-Region enthält und zu PHFs aggregieren kann (Olesen, 1994).

In unserer Arbeitsgruppe konnte HtrA1 bereits als A β Protease charakterisiert werden. Außerdem wurde eine Kolo-kalisation der Protease zu NFTs nachgewiesen (Grau *et al.*, 2005). Interessanterweise sind in der Literatur einige HtrA-Mitglieder analysiert worden, die unter verschiedenen Stressbedingungen überexprimiert werden und Teil einer Stressantwort sind, die durch aggregierte Proteine ausgelöst wird.

1.3.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Im Zytosol eukaryotischer Zellen können falschgefaltete Proteine ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut werden. Jedoch besitzen einige aggregierte Proteine, insbesondere Proteine die in neurodegenerativen Erkrankungen involviert sind, die Tendenz lösliche Oligomere und Aggregate auszubilden, die einen proteaseresistenten Kern besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass Fibrillen und lösliche Formen von A β und α -Synuclein die Funktion des Proteasoms stören (Lindersson *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass tau-Aggregate einen

inhibitorischen Effekt auf das Proteasom besitzen. Der Abbau von löslichen tau Monomeren ist jedoch über das Proteasom gewährleistet (Keck *et al.*, 2003).

1.4 Die HtrA-Familie

Die Mitglieder der HtrA-Familie gehören zu den Serinproteasen, die sich durch einen Serin-Rest im aktiven Zentrum auszeichnen. Etwa 35% aller Proteasen gehören zu dieser Klasse. Wichtige Mitglieder im Menschen sind Trypsin, Chemotrypsin und Elastase (Kaiser *et al.*, 1985). Die HtrA Proteasen sind hochkonserviert, sie kommen in RNA-Viren, Prokaryoten und in Eukaryoten vor. Sie besitzen einen variablen N-Terminus mit oder ohne Signalsequenz, eine katalytische Domäne (die der klassischen Trypsin-Protease ähnelt) und ein bis vier PDZ Domänen am C-Terminus (Abb. 1. 6).

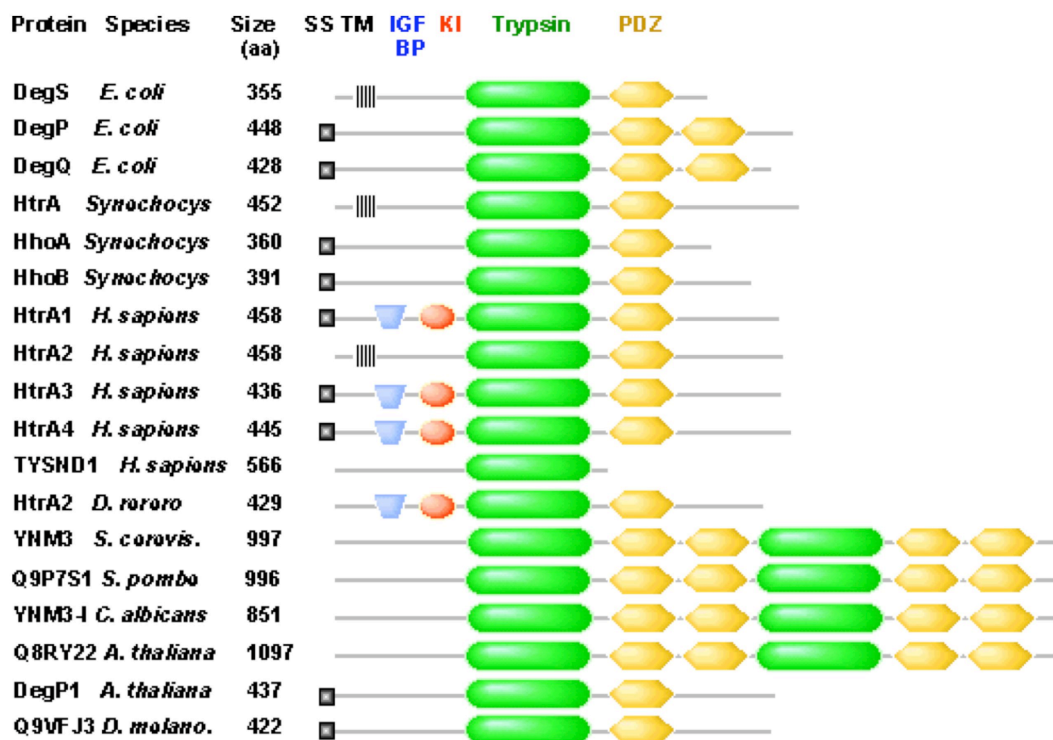


Abb. 1. 6 Domänen der HtrA-Familienmitglieder

Dargestellt ist die Organisation der Domänen von ausgewählten HtrA-Mitgliedern. Prokaryotische und eukaryotische Mitglieder sind abgebildet. Am N-Terminus befinden sich, bei manchen Mitgliedern, die Signal Sequenz (SS) oder das Transmembrane Segment (TM). Die *insulin growth factor binding domain* (IGFBP) ist in blau, die Kazal Proteaseinhibitor Domäne (KI) ist in rot, die Trypsin Domäne mit dem aktiven Zentrum ist in grün und die PDZ Domänen sind in gelb dargestellt (entnommen aus Clausen *et al.*, 2002).

Innerhalb der Trypsin Domäne befindet sich die katalytische Triade, die durch die As Histiden, Aspartat und Serin gebildet wird. Die Triade stellt das aktive Zentrum des Enzyms dar und ist für die Hydrolyse von Peptidbindungen essentiell. Die Deletion nur einer der drei As führt zum Verlust der proteolytischen Aktivität (Skórko-Glonek *et al.*, 1995).

Die PDZ Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. Ursprünglich wurde die PDZ Domäne bei eukaryotischen Proteinen (*Post-synaptic desity protein*, *Disc large*, *Zo-1-Protein*) beschrieben. Über Sequenzanalysen konnten prokaryotische Homologe identifiziert werden (Ponting *et al.*, 1997a; Ponting *et al.*, 1997b). Anschließend wurde mit Hilfe von Peptid-Bibliotheken die Spezifität von mehreren PDZ Domänen bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindetasche der PDZ Domänen eine Spezifität für hydrophobe As besitzt (Songyang *et al.*, 1997) und bevorzugt die drei oder vier C-terminalen Reste des Zielproteins bindet (Harris und Lim, 2001).

Im Gegensatz zu Trypsin, welches nach der Zymogeninduktion konstitutiv aktiv ist, können die HtrA Proteasen zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand reversibel umschalten (Clausen *et al.*, 2002). Für das Umschalten sind etliche Loopstrukturen und die PDZ Domänen verantwortlich (Swamy *et al.*, 1983). Viele HtrA-Familienmitglieder spielen eine bedeutende Rolle bei dem Abbau von falschgefalteten und ungefalteten Proteinen. Außerdem können einige Mitglieder die durch Hitzeschock oder andere Stressbedingungen induzierte Aggregation von Proteinen verhindern (Lipinska *et al.*, 1988).

1.4.1 *E. coli* HtrA Proteasen

Die Mitglieder der *E. coli* HtrA Proteasen sind DegP, DegS und DegQ. Sie können in zwei Klassen eingeteilt werden. DegS besitzt einen N-terminalen Transmembrananker und eine C-terminale PDZ Domäne. Die Protease ist im Periplasma lokalisiert. DegP und DegQ sind ebenfalls periplasmatische Proteasen, sind aber nicht an die Membran gebunden. Sie besitzen zwei PDZ Domänen (PDZ1 und PDZ2) und weisen eine ähnliche Substratspezifität auf (Kolmar *et al.*, 1996; Waller und Sauer, 1996).

Die Expression von DegS ist für die Überlebensfähigkeit des Bakteriums essentiell (De Las Penas *et al.*, 1997). DegS wird durch Stresssignale allosterisch aktiviert. Entstehen fehlgefaltete Proteine im Periplasma, z.B. Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, Omps), wird die Protease aktiviert und schneidet den Antisigmafaktor RseA zwischen Val₁₄₈ und Ser₁₄₉ (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001; Alba *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003). Dieser erste Schnitt löst eine Signalkaskade aus, an deren Ende Stress-regulierte-Gene überexprimiert werden (Hasenbein *et al.*, 2007). Die Kristallstruktur von DegS zeigte eine trimere Struktur, welche in Abwesenheit von fehlgefalteten Proteinen in einer inaktiven Konformation vorlag. Durch die Bindung C-terminalen Sequenzen von fehlgefalteten Omps kommt es zu einer Konformationsänderung, so dass die Protease in der aktiven Konformation vorliegt (Wilken *et al.*, 2004).

DegQ wurde identifiziert und charakterisiert von Bass *et al.* (Bass *et al.*, 1996) und Waller und Sauer (Waller und Sauer, 1996). Die Nullmutation von DegQ führt selbst unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu keinem Phänotyp (Waller und Sauer, 1996).

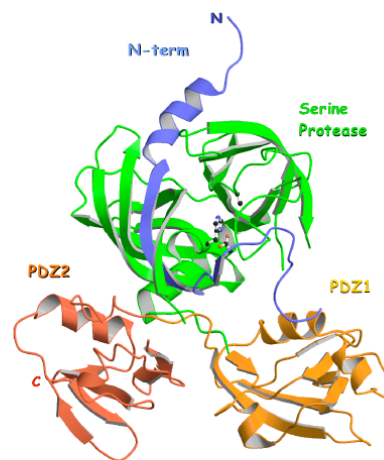
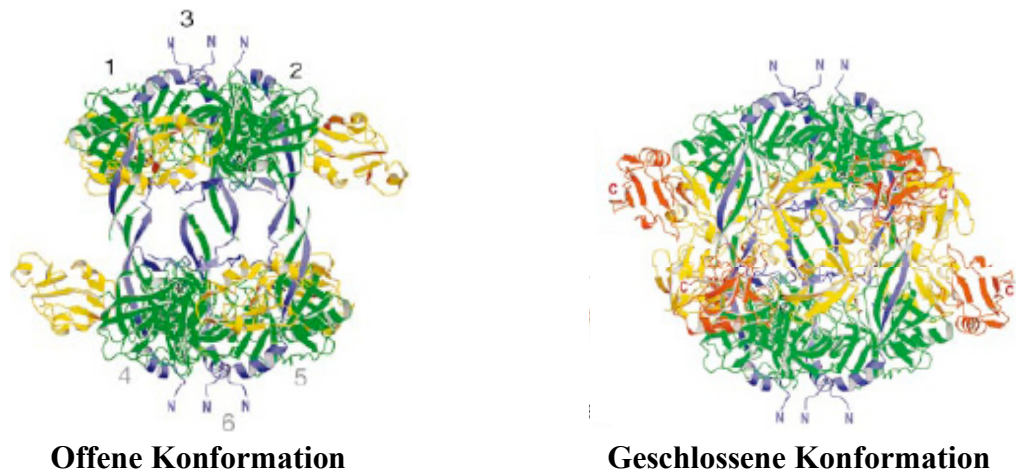
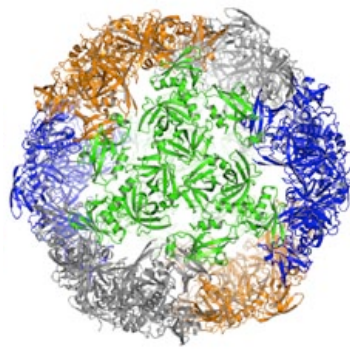
DegP wurde als erstes Mitglied der HtrA Proteasen durch zwei unabhängige Untersuchungen von Nullmutanten identifiziert. Die eine *degP* Mutante zeigte Defizite beim Abbau falschgefalteter Proteine im Periplasma (Strauch und Beckwith, 1988). Die andere Mutante, *high temperature requirement A* (*htrA*) genannt, zeigte eine Temperatursensitivität beim Zellwachstum (Lipinska *et al.*, 1988). Später konnte gezeigt werden, dass DegP eine bedeutende Rolle bei der extrazytoplasmatischen Stressantwort spielt. Während DegS nur RseA als Substrat akzeptiert, ist DegP in der Lage viele falschgefaltete periplasmatische Proteine abzubauen, dazu zählen das Maltose-Bindeprotein (MBP) (Betton *et al.*, 1998), die alkalische Phosphatase (PhoA) (Sone *et al.*, 1997) und die α -Amylase (MalS) (Spiess *et al.*, 1999). Außerdem kann DegP misslokalisierte Proteine wie Trehalase F (Tref) (Uhland *et al.*, 2000) und *Outer Membrane Protein F* (OmpF) abbauen

(Misra *et al.*, 2000). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass DegP eine Präferenz für falsch- und ungefaltete Proteine aufweist.

Interessanterweise besitzt DegP nicht nur eine Proteaseaktivität, sondern auch eine Chaperonaktivität. Der Wechsel zwischen den beiden Aktivitäten ist dabei Temperaturabhängig. Die Chaperonaktivität lässt sich hauptsächlich bei niedrigen Temperaturen (28°C) nachweisen, wohingegen die Proteaseaktivität ab einer Temperatur von 30°C feststellbar ist und nicht linear ansteigt, was DegP auch als Hitzeschockprotein auszeichnet (Spiess *et al.*, 1999).

Die erste Kristallstruktur von DegP zeigte eine hexamere Struktur, in der das katalytische Zentrum in der inaktiven Konformation vorlag (Krojer *et al.*, 2002). Das Hexamer lagert sich aus zwei Trimeren zusammen, diese Zusammenlagerung wird durch die LA-Loops der Untereinheiten ermöglicht. Sie formen Säulen, die für die Bildung eines Tunnels verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass der LA-Loop eines Monomers mit dem aktiven Zentrum des Monomers auf der gegenüberliegenden Seite interagiert (Abb. 1. 7 B). Außerdem bilden die PDZ Domänen die flexiblen Seitenwände des Käfigs aus.

Weiterführende Studien haben gezeigt, dass sich DegP in Anwesenheit von fehlgefalteten Proteinen zu einem 24mer zusammenlagert (Abb. 1.7 C). Krojer *et al.* konnten die Kristallstruktur des 24mers mit gebundenen Omp Monomeren zeigen und stellten fest, dass sich Trimere Einheiten zu einem 24mer zusammenlagern. In der gleichen Arbeit konnte durch Elektronenmikroskopie die Struktur eines 12meren Partikels dargestellt werden (Krojer *et al.*, 2008).

(A) Monomer**(B) Hexamer****(C) Tetracosamer****Abb. 1. 7 Die Kristallstruktur von *E. coli* DegP**

Monomeres DegP und seine Untereinheiten sind gezeigt. Die einzelnen Untereinheiten sind farblich markiert: der N-terminus ist blau, die Proteasedomäne ist grün, die PDZ1 ist orange und die PDZ2 ist rot dargestellt (A). Seitenansicht des Hexameres in zwei Konformationen: offen (links) und geschlossen (rechts). Die unterschiedlichen Domänen sind ebenfalls farblich markiert. Die Untereinheiten sind in der offenen Konformation nummeriert (B). Da die PDZ1 Domäne sehr flexibel ist, konnte sie in der offenen Konformation nicht dargestellt werden (entnommen aus Krojer *et al.*, 2002). Kristallstruktur des 24meren DegPs (C) (entnommen aus Krojer *et al.*, 2008).

1.4.2 Humane HtrA Proteasen

Die humanen HtrAs bestehen aus vier Mitgliedern: HtrA1 (Zumbrunn und Trueb, 1996; Hu *et al.*, 1998), HtrA2/Omi (Faccio *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2000), HtrA3 (Nie *et al.*, 2003) und HtrA4 (Clausen *et al.*, 2002). Sie können in zwei Klassen eingeteilt werden. HtrA2 besitzt ein N-terminales Transmembransegment. HtrA1, HtrA3 und HtrA4 besitzen ein N-terminales Signalpeptid, eine *insulin-like growth factor* (IGF)-Bindedomäne und eine Domäne, die eine Homologie zu der *Kazal Type* Proteaseinhibitor-domäne aufweist. Alle humanen HtrA Proteasen haben im Anschluss an den N-Terminus eine Proteasedomäne, welche die katalytische Triade und eine PDZ Domäne enthält (Clausen *et al.*, 2002).

Das *HTRA2*-Gen ist auf Chromosom 2p12 lokalisiert. Das Protein ist wahrscheinlich ein mitochondriales Protein und ist über sein Transmembransegment mit der Membran verbunden. Innerhalb der regulatorischen Domäne befindet sich eine Phosphorylierungsseite an Position 142. Stressaktivierte Kinasen phosphorylieren HtrA2 an dieser Stelle und regulieren damit die proteolytische Aktivität (Faccio *et al.*, 2000). Außerdem befindet sich in der regulatorischen Region ein Protein-Protein Interaktions-Motiv (Savopoulos *et al.*, 2000). HtrA2 ist das einzige humane HtrA Protein von dem eine Kristallstruktur veröffentlicht wurde. So konnten Li *et al.* eine trimere Grundstruktur des Proteins nachweisen (Li *et al.*, 2002a).

Nach UV Bestrahlung löst sich HtrA2 aus dem Membranzwischenraum und ist zytoplasmatisch lokalisiert, wo es *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAP) spaltet (Verhagen *et al.*, 2002). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass HtrA2 bei neuromuskulären Erkrankungen involviert ist (Jones *et al.*, 2003).

Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass HtrA2 bei der zellulären Stressantwort eine Rolle spielt. In einem Mausmodell mit einer Nieren-Ischämie konnte gezeigt werden, dass die Expression von HtrA2 erhöht ist. Außerdem konnte eine erhöhte Expression in Zellen nach einem Hitzeschock und Tunicamycin-Behandlung festgestellt werden (Gray *et al.*, 2000).

Mäuse, die eine homozygote Deletion oder Punktmutation des *HTRA2*-Gens aufweisen, welche zu einer eingeschränkten Proteaseaktivität führt, sterben frühzeitig. Außerdem entwickeln sie einen Phänotypen, der vergleichbar mit der Parkinsonschen Krankheit ist (Jones *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004). Zwei Mutationen in dem *HTRA2*-Gen konnten

mit der Parkinsonschen Erkrankung direkt in Verbindung gebracht werden (Plun-Faverau *et al.*, 2007).

Die Gene von *HTRA3* und *HTRA4* sind auf dem Chromosom 4p16.1 und 8p11.22 lokalisiert. Die Proteine sind bis jetzt noch nicht sehr gut charakterisiert (Clausen *et al.*, 2002).

Das Gen von HtrA1 wird *PRSS11* genannt und ist auf dem Chromosom 10q26 lokalisiert. Das Protein wird als Vorläuferprotein synthetisiert. Nach Abspaltung der Signalsequenz hat es ein Molekulargewicht von 51 kDA. HtrA1 besteht aus folgenden Elementen: eine N-terminale 22 Aa lange Signalsequenz, eine mac25 Domäne, eine Proteasedomäne und eine C-terminale PDZ Domäne.

Die Lokalisation der HtrA1 Protease ist zu 80% extrazellulär und zu 20% intrazellulär. Es ist nicht geklärt, ob das intrazellulär lokalisierte HtrA1-Protein erst die Zelle verlässt und dann über einen unbekannten Mechanismus wieder in die Zelle transportiert wird oder ob 20% der Proteinmenge nie die Zelle verlässt (Grau *et al.*, 2005). Nach der Signalsequenz, schließt sich die mac25 Domäne an. Die mac25 Domäne weist Ähnlichkeit mit den *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBPs) auf. Obwohl die mac25 Domäne ursprünglich als Bindungs-Domäne von IGFs identifiziert wurde, fand man später heraus, dass die Domäne eher mit Follistatin, einem Activin-bindenden Protein, verwandt ist (Kato *et al.*, 2000). Man vermutet, dass HtrA1 biologische Prozesse über die mac25 regulieren kann, z.B. konnte die Bindung von *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), welches ein Activin-Protein ist, nachgewiesen werden. In der mac25 Domäne befinden sich 12 Cystein-Reste, welche Disulfidbrücken ausbilden. Daran schließt sich eine Kazal-Typ-Inhibitor Domäne an, in der sich ebenfalls vier Cystein-Reste und konservierte Tyrosin-Reste befinden (Zumbrunn und Trueb, 1996).

Die HtrA1 Expression ist in der Plazenta sehr hoch, im Gehirn, der Leber und der Niere deutlich und in der Lunge, den Skelettmuskeln, dem Herz und dem Pankreas schwach (Zumbrunn und Trueb 1996). Die HtrA1 Protease wurde als herunterreguliertes Gen in SV40-transformierten Fibroblasten identifiziert (Zumbrunn und Trueb 1996). Auch in Tumoren stellte man fest, dass HtrA1 stark herunterreguliert war. Die Überexpression von HtrA1 inhibiert die Proliferation und das Tumorwachstum und führt zur Apoptose. Diese Funktionen sprechen dafür, dass es sich bei HtrA1 um einen Tumorsuppressor handelt (Baldi *et al.*, 2002; Shridhar *et al.*, 2002; Chien *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu dem bakteriellen DegP ist HtrA1 kein HSP. Dennoch scheinen generelle Stressantworten zu einer erhöhten Expression der Protease zu führen. So konnte eine erhöhte Expression von HtrA1 während Osteoarthritis (Hu *et al.*, 1998) und während der Alterung festgestellt werden (Ly und Handelsman, 2002).

In vitro wurde die proteolytische Spaltung von β -casein durch die HtrA1 Protease gezeigt (Hu *et al.*, 1998). Außerdem können extrazelluläre Matrixproteine (Grau *et al.*, 2006) und APP-Fragmente wie A β (Grau *et al.*, 2005) von HtrA1 abgebaut werden. Es finden sich auch verschiedene Hinweise in der Literatur, die zeigen, dass HtrA1 am TGF- β Signalweg beteiligt ist. HtrA1 Expressions-Analysen von Mäusen innerhalb der Embryogenese zeigten, dass HtrA1 in Gewebe erhöht exprimiert wird, wo die Entwicklung maßgeblich durch das TGF- β -Protein reguliert wird (Oka *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung von TGF- β durch HtrA1 eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung und dem Überleben von neuronalen Zellen spielt (Launay *et al.*, 2008).

Interessanterweise wurde vor kurzem ein einzelner Nukleotid Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs11200638 in der Promotorregion des *HTRA1*-Gens mit einem erhöhten Risiko an altersbedingter Makulardegeneration (*aged-related macular degeneration*, AMD) zu erkranken in Verbindung gebracht (Dewan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Da der SNP nur im Zusammenhang mit AMD analysiert wurde, ist es von großem Interesse zu untersuchen, ob der SNP auch in anderen Erkrankungen, wie z.B. bei AD, eine Bedeutung hat.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Rolle der humanen Serinprotease HtrA1 in AD zu charakterisieren. Dadurch sollen neue Erkenntnisse über die Funktion der HtrA1 Protease, ihre mögliche Bedeutung beim Abbau von toxischen Ablagerungen und für die Protein-Qualitätskontrolle gewonnen werden.

Zunächst soll durch biochemische und zellbiologische Methoden analysiert werden ob HtrA1 eine wirksame Protease ist, die lösliches als auch aggregiertes tau-Protein abbauen kann. In diesem Zusammenhang soll mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie die subzelluläre Lokalisation von HtrA1 und die Koloalokalisation mit tau dargestellt werden. Um zu zeigen, dass die HtrA1 Funktion auch *in vivo* relevant ist, sollen die HtrA1- und tau-Proteinmengen in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen verglichen werden. Es soll ebenfalls geklärt werden, ob HtrA1 Teil einer bisher unbekannten zellulären Stressantwort ist, die durch erhöhte tau Mengen angeschaltet wird.

Mehrere Gene scheinen das Risiko zu beeinflussen an AD zu erkranken. Ein Genlocus auf Chromosom 10 wurde mit einem verfrühten Erkrankungsalter in Verbindung gebracht. In diesem Locus befindet sich das *HTRA1*-Gen (Li *et al.*, 2002b). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung des SNP rs11200638 in der Promotorregion des *HTRA1*-Gens. Es soll geklärt werden, ob der SNP mit einem erhöhten Risiko an AD zu erkranken in Verbindung gebracht werden kann.

Die Arbeiten von Grau *et al.* (Grau *et al.*, 2005) haben gezeigt, dass natives und oligomeres A β *in vitro* von HtrA1 abgebaut werden kann. Es soll deshalb geklärt werden, ob HtrA1 auch in der Lage ist die A β -Proteinmenge in Gehirngewebe zu reduzieren. Diese Fragestellung soll in humanen, als auch in murinem Gehirngewebe mittels ELISA analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 2. 1 Verwendete Bakterienstämme

| <i>E. coli</i> Stamm | Genotyp | Referenz |
|------------------------|--|-----------------------------|
| DH5α | <i>F</i> -, <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res</i> -, <i>mod</i> +), <i>deoR</i> | Hanahan, 1983 |
| BL21 (D3 plus) Rosetta | <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB</i> -, <i>mB</i> -), <i>gal</i> (λ <i>cl</i> <i>ts857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i>), <i>dcm</i> (D3) | Studier und Moffat, 1986 |

2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

2.1.2.1 Nährmedien

NZA Medium (1 l)

10 g NZ-Amin

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

Luria Bertani (LB) Vollmedium (1 l)

10 g Bacto-Trypton

10 g NaCl

5 g Hefe-Extrakt

0,25% (v/v) 2 M NaOH

LB-Platten-Agar

LB-Medium

1,6% (w/v) Bacto-Agar

2.1.2.2 Antibiotika

Ampicillin

100 µg/ml Medium

Chloramphenicol

25 µg/ml Medium

Kanamycin

25 µg/ml Medium

2.1.3 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 2. 2 Verwendete eukaryotische Zelllinien

| Bezeichnung | Organismus | Spezifikation |
|-------------|--------------------------|-------------------------------|
| HEK-293T | <i>Homo sapiens</i> | Embryonale Nierenzellen |
| PC12 | <i>Rattus norvegicus</i> | Pheochromozytom Zellen |
| U373-MG | <i>Homo sapiens</i> | Glioblastom-Astrozytom Zellen |

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Trypsin/EDTA

Fötales Kälberserum (FCS)

Pferdeserum

Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml PenicillinG, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat)

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen, Paisley, Schottland bezogen.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Acrylamid

30% Rotiphorese Gel

Ameisensäure

70% (v/v) Ameisensäure

Anfangspuffer-A

50 mM HEPES-NaOH,

50 mM NaCl

pH an Endpuffer-A angleichen

AP-Färbelösung

10 ml AP-Puffer

0,66% (v/v) NBT (50 mg/ml in 70% DMF)

0,33% (v/v) BCIP (50 mg/ml in 70% DMF)

AP-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

Coomassie-Puffer II

10% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Acetat
0,005% (w/v) Coomassie R250

Coomassie-Puffer IV

10% (v/v) Acetat

Dialysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
300 mM NaCl

10x Elektrophoresepuffer

333 mM Tris-HCl
1% (w/v) SDS
1,92 M Glycin

Endpuffer-A

50 mM HEPES-NaOH
50 mM NaCl
29 mM KH₂PO₄
471 mM K₂HPO₄
pH nicht einstellen

Coomassie-Puffer I

25% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Acetat
0,05% (w/v) Coomassie R250

Coomassie-Puffer III

10% (v/v) Acetat
0,002% (w/v) Coomassie R250

Cross-Linking-Puffer

50 mM NaH₂PO₄, pH 7,5
1% (v/v) Formaldehyd

6x DNA-Probenpuffer

30% (v/v) Glycin
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,025% (w/v) Xylencyanol

Elutionspuffer-A

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM β-Mercaptoethanol
150 mM Imidazol

Galattipuffer

220 mM Zitronensäure, pH 3,95
0,34% (v/v) H₂O₂

Lagerungspuffer

80 mM PIPES-KOH, pH 6,8

1 mM EGTA

1 mM MgCl₂Lysispuffer-B

33 mM Tris-HCl, pH 8,0

100 mM KCl

Protease-Inhibitor-Cocktail

Neutralisierungspuffer

1 M Tris Base

380 mM Na₂HPO₄PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10,2 mM Na₂HPO₄1,8 mM KH₂PO₄Ponceau S Rot-Lösung

0,2% (v/v) Ponceau S

10% (v/v) Trichloressigsäure

10x Lysispuffer-A500 mM NaH₂PO₄, pH 7,5

3 M NaCl

Lysispuffer-ez

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

100 mM MgCl₂

150 mM NaCl

1 mM EDTA

10% (v/v) Glycin

1% (v/v) TritonX-100

0,1% (w/v) SDS

Protease-Inhibitor-Cocktail

20x NuPAGE-Elektrophoresepuffer

1 M Tricin

1 M Tris Base

70 mM SDS

PBS-T Waschpuffer

PBS

0,05% (v/v) Tween 20

Reaktionspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

SDS-Laufpuffer

240 mM Tris-HCl, pH 6,8
8% (w/v) SDS
40% (v/v) Glycerin
0,04% (w/v) Bromphenolblau
30 mM DTT

SDS-Sammelgelpuffer

0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,4% (w/v) SDS

Stopplösung

7% (v/v) H₂SO₄

10x TBS

200 mM Tris-HCl, pH 7,5
1,5 M NaCl

THB-Puffer

20 mM Tris Base
250 mM Sucrose
1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
Protease-Inhibitor-Cocktail

Waschpuffer-A I

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM β-Mercaptoethanol

4x SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl, pH 6,8
8% (w/v) SDS
40% (v/v) Glycerin
0,04% (w/v) Bromphenolblau
30 mM DTT

SDS-Trenngelpuffer

1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,4% (w/v) SDS

50x TAE-Puffer

50 mM EDTA
2 M Tris-Acetat, pH 8,0

TBST-Waschpuffer

TBS
0,1% (v/v) Tween 20

Transferpuffer

15 mM Tris-HCl, pH 8,3
120 mM Glycin
20% (v/v) Methanol
0,2% (w/v) SDS

Waschpuffer-A II

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM β-Mercaptoethanol
30 mM Imidazol

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in Aqua bidest. angesetzt.

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Tab. 2. 3 Verwendete Primärantikörper

| Bezeichnung, Spezifität | Organismus, Typ | Firma |
|---------------------------|-----------------|---------------------------|
| α -Aktin | Maus, mAB | MP Biomedicals, Soln, USA |
| α -HIS | Maus, mAB | Invitrogen, Karlsruhe |
| α -human HtrA1 | Kaninchen, pAB | Universität, Konstanz |
| α -human HtrA1 | Maus, mAB | Universität, Cardiff, GB |
| α -human HtrA1 | Maus, mAB | R&D Systems, Wiesbaden |
| α -human Tau | Maus, pAB | Invitrogen, Karlsruhe |
| α -human Tau-P-396 | Maus, mAB | Invitrogen, Karlsruhe |
| α -Tubulin | Maus, mAB | Invitrogen, Karlsruhe |

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Tab. 2. 4 Verwendete Sekundärantikörper

| Bezeichnung, Spezifität | Konjugat | Firma |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Ziege α -Maus IgG | Alexa Fluor [®] 488 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Ziege α -Maus IgG | Alkalische Phosphatase | Sigma-Aldrich, München |
| Ziege α -Kaninchen IgG | Alkalische Phosphatase | Dako Cyomation, Glostrup, Dänemark |
| Ziege α -Maus IgG | Meerrettich-Peroxidase | GE Healthcare, München |
| Esel α -Kaninchen IgG | Meerrettich-Peroxidase | GE Healthcare, München |
| Schwein α -Kaninchen IgG | Biotin | Dako Cyomation, Glostrup, Dänemark |

Zum Nachweis von F-Aktin im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop wurde Alexa-488-gekoppeltes Phalloidin der Firma Invitrogen, Karlsruhe eingesetzt.

2.1.7 Biochemikalien und Chemikalien

2.1.7.1 Proteine und Enzyme

| | |
|---|----------------------------|
| DNaseI | Sigma-Aldrich, München |
| PHF ¹ | Universität, Osnabrück |
| Phusion-Polymerase | NEB, Beverly, USA |
| Restriktionsendonukleasen (<i>EagI</i> , <i>BstZI</i> , <i>EaeI</i> , <i>BsiEI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>) | NEB, Beverly, USA |
| Rinderserum (BSA) | Sigma-Aldrich, München |
| T4-DNA-Ligase | Roche Diagnostic, Mannheim |

2.1.7.2 Protein- und Nukleinsäurestandards

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 2-log DNA Ladder | NEB, Beverly, USA |
| HiMark™ Prestained HMW Standard | Invitrogen, Karlsruhe |
| peqGold Protein Marker | PEGLAB Biotechnologie, Erlangen |
| Prestained SDS-PAGE Standard | Bio-Rad, München |
| Unstained SDS-PAGE Standard | Bio-Rad, München |

¹ freundlicherweise von Prof. Brandt, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt

2.1.7.3 Chemikalien

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Agarose | Cambuer, Rockland, USA |
| Bradford Reagenz (Roti-Nanoquant) | Roth, Karlsruhe |
| DMSO | Serva, Heidelberg |
| DTT | Merck, Darmstadt |
| Entwickler für Röntgenfilme | Adefo, Dietzenbach |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Fixierer für Röntgenfilme | Adefo, Dietzenbach |
| Formaldehyd | Sigma-Aldrich, München |
| IPTG | Acuos, Geel, Belgien |
| Polybren | Sigma-Aldrich, München |
| Ponceau S Rot | Roth, Karlsruhe |
| Prolong Gold | Invitrogen, Karlsruhe |
| Protease-Inhibitor-Cocktail | Roche Diagnostics, Mannheim |
| SDS-b | Serva, Heidelberg |
| Triton-X 100 | Merck, Darmstadt |

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen.

2.1.8 Vektoren

Tab. 2. 5 Verwendete Vektoren

| Vektor | Referenz |
|---------------|----------------------|
| pET26 | Merk, Darmstadt |
| pmCherry-N1 | Clontech, Heidelberg |

2.1.9 Plasmide

Tab. 2. 6 Verwendete Plasmide

| Plasmid | Beschreibung |
|--|--|
| pET-wt-tau | pET3d mit wt-tau 352 As ¹ |
| pET-PHP-tau | pET3d mit PHP-tau 352 As ¹ |
| pET-Ala-tau | pET3d mit Ala-tau 352 As ¹ |
| pET-HtrA1 | pET26 mit Δ mac25HtrA1 ² |
| Δ ssHtrA1SA-Cherry | pmCherry-N1 mit Δ ssHtrA1SA ³ |
| Δ mac25HtrA1SA-Cherry | pmCherry-N1 mit Δ ss Δ mac25HtrA1SA ³ |
| Δ ss Δ PDZHtrA1SA-Cherry | pmCherry-N1 mit Δ ss Δ PDZHtrA1SA ³ |
| PDZ-Cherry | pmCherry-N1 mit PDZ-HtrA1 ³ |
| tau-GFP | pEGFP-C3 mit tau 352 As ⁴ |
| pBABE LV | retroviraler Vektor ⁵ |
| MP7171-iGFP | retroviraler Vektor mit GFP-Insert ⁵ |
| pBABE-HtrA1 | retroviraler Vektor mit HtrA1-Insert ² |
| pLKO.1puro LV | lentiviraler Vektor ⁵ |
| pRRLU6 CPPT pSK GFP | lentiviraler Vektor mit GFP-Insert ⁵ |
| pLKOshHtrA1rat | lentiviraler Vektor mit shHtrA1rat-Insert ³ |
| pHIT G | Hilfsvektor VSV-G env zur Pseudotypisierung von Retro- und Lentiviren ⁵ |
| pCMV Δ R8.2 | Hilfsvektor gag/pol für Lentiviren ⁵ |
| pHIT 60 | Hilfsvektor gag/pol für Retroviren ⁵ |

¹ freundlicherweise von Prof. Brandt, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt

² Plasmide stammt aus früheren Experimenten der Arbeitsgruppe

³ Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

⁴ freundlicherweise von Prof. Dehmelt, Max-Planck-Institut (MPI) Dortmund, zur Verfügung gestellt

⁵ freundlicherweise von Prof. Hahn, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt

2.1.10 Oligonukleotide

Tab. 2. 7 Verwendete Oligonukleotide

| Name | Sequenz 5'-3' |
|-----------------------------------|---|
| Δ ssHtrA1-for | AAGGAAAAAACTCGAGGCCACCATGCAGC GCTGTCCCGGGCC |
| Δ ssHtrA1-rev | AAAAAGGCGAATTCCTGGGTCAATTTCTTC GGG |
| Δ mac25HtrA1-for | AAGGAAAACTCGAGGCCACCATGGAGAGG CTGCACCGG |
| Δ ss Δ PDZHtrA1-rev | AAAAAGGCGAATTCGAGGAACTTTTAAAT CTTATCAGATGGG |
| PDZ-HtrA1-for | AAGGAAAACTCGAGGCCACCATGACGGAGT CCCATGAC |
| HtrA1-rat-qRT-PCR-for | CCTTTTTGATGACATCACTGACATC |
| HtrA1-rat-qRT-PCR-rev | GATGTAAT-CTCCGGAGCATATATC |
| Aktin-rat-qRT-PCR-for | GATTACTGCTCTGGCTCCTAG |
| Aktin-rat-qRT-PCR-rev | ACTCATCGTACTCCTGCTTGC |
| HtrA1-human-qRT-PCR-for | GCAACTCAGACATGGACTACATC |
| HtrA1-human-qRT-PCR-rev | GTGTTAATTCCAATCACTTCACCG |
| GAPDH-human-qRT-PCR-for | GCTTGTCATCAATGGAAATCCC |
| GAPDH-human-qRT-PCR-rev | AGCCTTCTCCATGGTGG |
| Rib.Prot.-human-qRT-PCR-for | GGTGGTCGTACGCTGTG |
| Rib.-Prot.-human-qRT-PCR-rev | GGTCCGCCAGAAGATGC |
| HtrA1-mouse-qRT-PCR-for | GTGCTCTCTGGGGCATATATC |
| HtrA1-mouse-qRT-PCR-rev | ATGACATCGCTGACGTCATTG |
| Aktin-mouse-qRT-PCR-for | GATTACTGCTCTGGCTCCTAG |
| Aktin-mouse-qRT-PCR-frev | ACTCATCGTACTCCTGCTTGC |
| HtrA1-rat-pLKO-for | CCGGAATCTCCGGAGCATATATCATCTCGA GATGATATATGCTCCGGAGATTTTTTTG |
| HtrA1-rat-pLKO-rev | TAATTCAAAAAAATCTCCGGAGCATATATC ATCTCGAGATGATATATGCTCCGGAGATT |

2.1.11 Synthetische Peptide

Tab. 2. 8 Verwendete synthetische Peptide

| Name | Sequenz | Molekulargewicht (in Da) |
|------------------------|----------------|--------------------------|
| tau-2-pNA ¹ | KSKIGSTENL | 1196,3 |
| tau-3-pNA ¹ | KHQPGGGKV | 1027,1 |
| tau-4-pNA ¹ | VYKPVDLSKV | 1267,5 |
| tau-5-pNA ¹ | PGGGNKKIETHKL | 1498,7 |
| tau-6-pNA ¹ | TFRENAKA | 1056,1 |
| Iβ-pNA ¹ | FANQHLCGSHLVEA | 1644,8 |
| RseA-pNA ¹ | FNTLPMMGKASPV | 1611,9 |
| Inhibitor ¹ | DPMFKLV | 969,2 |

Alle Peptide und der Inhibitor wurden in DMSO gelöst.

2.1.12 Komplettsysteme

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| ECL Chemolumineszenz-Kit (West Pico) | Perbio Science, Bonn |
| ELISA Aβ42/40 | Genetic company, Schlieren, Schweiz |
| ELISA tau/tauP-396 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Jet-PEI™ | Biomol, Hamburg |
| Nucleobond Xtra Maxi | Macherey-Nagel, Düren |
| NucleoSpin® RNA II | Macherey-Nagel, Düren |
| QIAamp® DNA Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin PCR purification Kit | Qiagen, Hilden |
| QIA Spin Gel Extraktion Kit | Qiagen, Hilden |
| QPCR SYBR Green Mix | Thermo Scientific, Waltham MA, USA |
| RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Verso cDNA Kit | Thermo Scientific, Waltham MA, USA |

¹ die Peptidsynthese erfolgte in Kooperation mit dem Chemical-Genomis-Center (CGC) in Dortmund

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|-------------------------------------|
| Deckgläser 24 x 24 mm | Menzel, Braunschweig |
| Dialysemembran ZelluTrans T1 | Roth, Karlsruhe |
| CryoTube Vials | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| ELISA-Vertiefungsplatte | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Gewebekulturflaschen T25 und T75 | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Hydroxyapatite Bio-Gel HAT Gel | BioRad, München |
| Laborsäule XK 16/20 | GE Healthcare, Uppsala, Schweden |
| Life cell wells, Glass Bottom Culture Dishes | MatTek, Ashland MA, USA |
| Ni-NTA Superflow | Qiagen, Hilden |
| NuPAGE Novex Midi Gel | Invitrogen, Karlsruhe |
| PVDF Membran | GE Healthcare, Buckinghamshire, GB |
| Röntgenfilme | GE Healthcare, Buckinghamshire, GB |
| Vivaspin 15R, 10 kDA | Santorum Stedium Biotech, Göttingen |
| Vivaspin 15R, 30 kDA | Santorum Stedium Biotech, Göttingen |

2.1.14 Geräte

| | |
|---|------------------------------------|
| Absaugpumpe Typ N811KN.18 | KNF Neuberger, Freiburg |
| Autoklav | BeliMed, Mühlheim am Inn |
| CO ₂ -Inkubator HEPA Class 100 | Thermo Scientific, Waltham MA, USA |
| DNA-Gelelektrophoresekammer | Peqlab, Erlangen |
| Elektrophoreseapparatur | Bio-Rad, München |
| FPLC, BioLogic Duo Flow | Bio-Rad, München |
| Geldokumentation | Intas, Göttingen |
| Horizontalschüttler | Grant Böckler, Cambridge, GB |
| Inkubationsschüttler Innova 44 | New Brunswick, New Jersey, USA |
| Konfokales-Mikroskop (TCS-SP5) | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Magnetenrührer RH basic 2 | IKA, Staufen |
| M-100L Microfluidizer Processor | Microfluidics, Newton, USA |
| Neubauerzählkammer | Hecht-Assistent, Sondheim |

| | |
|---|---------------------------------|
| PAGE-Kammer Mini Trans-Blot Cell | BioRad, München |
| PCR-Gerät Thermocycler Personal | Biometra, Göttingen |
| Pipetten Eppendorf Research | Eppendorf, Hamburg |
| pH-Meter | Schott, Mainz |
| qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000 | Corbett Research, Cambridge, GB |
| Scanner | UMAX, Astra 4000U |
| Sicherheitswerkbank HERA safe, HS12 | Heraeus, Hanau |
| Spectrometer Genios Pro | Tecan, Crailsheim |
| Spektralphotometer Smart Spec Plus | Bio-Rad, München |
| Standzentrifuge Avanti J-E | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge Centrifuge 5415R | Eppendorf, Hamburg |
| UV-Transilluminator Gel Imager | Intas, Göttingen |
| Waagen | Kern, Balingen-Frommern |
| Western-Blot Apparaturen | Bio-Rad, München |
| XCell4 SureLock Midi-Cell | Invitrogen, Karlsruhe |
| Zentrifuge: Biofuge fresco | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge: Optima LE-80K Ultracentrifuge | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |

2.1.15 Computer-Software

| | |
|--------------------------|--|
| Acrobat Reader® 8.0 | Adobe System Inc, San Jose, USA |
| EndNote | Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA |
| GraphPad Prism5 | Statcon, Statistiksoftware Shop, Witzenhausen |
| Leica Software | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Office 2004 | Microsoft Corporation®, Redmond, USA |
| Photoshop® 8 | Adobe System Inc, San Jose, USA |
| RotorGene | Rcorbett Research, Qiagen, Hilden |
| Vektor-NTI®, Version 6.0 | InforMax, Invitrogen, Karlsruhe |
| Weblogo 3 | WebLogo, California, USA |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zur Überprüfung der genotypischen Korrektheit von Plasmiden und zur DNA-Klonierung durchgeführt. Diese Methode macht sich die Eigenschaft von doppelsträngiger-DNA zu nutze, sich bei hohen Temperaturen in ihre Einzelteilstränge aufzutrennen. Durch die Verwendung einer hitzestabilen Polymerase und selektiven, komplementären *Primern* kann die DNA verdoppelt werden. Bei mehrfacher Wiederholung steigt die Anzahl der Kopien des gewünschten DNA-Fragments und somit seine Menge exponentiell an (Mullis *et al.*, 1992). Die vorgenommenen PCR-Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

| <u>Ansatz</u> | | <u>Programm</u> |
|----------------------------------|-----------|-----------------|
| Template-DNA | 20-200 ng | 2 min bei 94°C |
| 5x Phusion Puffer | 10 µl | 30 s bei 94°C |
| 25 mM dNTPs | 10 µl | 30 s bei 68°C |
| 10 pmol/µl <i>Primer</i> forward | 2 µl | 90 s bei 72°C |
| 10 pmol/µl <i>Primer</i> reverse | 2 µl | 120 s bei 72°C |
| DMSO | 10 µl | kühlen bei 4°C |
| 5 U/µl Phusion-Polymerase | 1 µl | |
| Aqua bidest. | ad 50 µl | |

} 30 Zyklen

Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Das PCR-Produkt wurde aus der Agarose zurückgewonnen und gegebenenfalls mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, um komplementäre Enden für eine Klonierung zu erhalten.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente erfolgt anhand ihrer Größe mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese (McDonnell *et al.*, 1977). Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste des DNA-Rückgrats wandern DNA Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei aufgrund des Widerstandes der Agarose-Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge.

Es wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet (0,8-2 g Agarose auf 100 ml 1x TAE). Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer gemischt und die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 120 V für ca. 1 h. Zum Größenvergleich wurde der DNA-Längenmarker 2-log DNA Ladder genutzt.

Zur Detektierung der DNA-Banden wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,4%) für ca. 20 min inkubiert. Die Identifizierung der DNA-Fragmente erfolgt durch Detektion des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 312 nm auf der Geldokumentation-Anlage. Gegebenenfalls wurde die gewünschte DNA-Fragmentbande für präparative Zwecke aus dem Gel isoliert.

2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Auf der Geldokumentations-Anlage wurde die gewünschte DNA-Bande mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIA Spin Gel Extraktion Kit gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.4 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an jeweils spezifischen palindromischen DNA-Sequenzen und erzeugen dabei entweder stumpfe (*blunt ends*) oder überhängende (*sticky ends*) Enden. Bei der Wahl der Pufferbedingungen, Inkubationstemperaturen und Inkubationszeiten wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt.

2.2.5 Ligation

DNA-Ligasen sind Enzyme, die freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA durch eine Phosphodiesterbindung verknüpfen. Für die Ligation von DNA Fragmenten mit überhängenden Enden wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:6 in 10 µl Aqua bidest. mit 10 µl 2x T4-DNA-Ligase Puffer und 1 µl Ligase (2000 Units) gemischt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 10 min. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem das Insert durch Wasser ersetzt wurde. Hierdurch wurde überprüft, inwieweit eine Selbstligation des Vektors stattfand.

2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Damit Bakterien Plasmid-DNA in ausreichendem Maß aufnehmen können, müssen diese kompetent gemacht werden (Methode modifiziert nach Chung *et al.*, 1989). Dazu wurden 5 ml NZA-Medium mit einem Einzelklon beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml NZA-Medium mit der Vorkultur beimpft, so dass eine OD₆₀₀ von 0,1 erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 37°C auf einem Schüttler, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert, damit die Bakterien die log-Wachstumsphase erreichen konnten. Anschließend wurde die Kultur für 10-15 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Zellen bei 4°C für 15 min bei 4000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 17 ml 10% Glycerin und mit 4 ml 10% Glycerin wurden die Zellen zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

2.2.7 Transformation kompetenter *E. coli*

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien.

Kompetente *E. coli* Zellen wurden schonend auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 100 µl Bakterien mit einem Viertel eines Ligationsansatzes gemischt und danach für 20 min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurde der Ansatz 1 min bei 42°C im

Heizblock erwärmt, um die Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Bakterien zu ermöglichen. Es folgte eine Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl NZA-Medium wurde die Bakterien-Suspension für 1 h bei 37°C geschüttelt. Diese Inkubationsphase ermöglichte die Regeneration der Bakterien und die Ausbildung der mit dem Plasmid transformierten Antibiotika-Resistenz. Anschließend wurden die Zellen 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Danach wurde die Suspension auf einer vorgewärmten NZA-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und die Agarplatte über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Mit der Impföse werden einige Bakterien eines Klons von der NZA-Agarplatte in Medium überführt und über Nacht im Schüttelinkubator mit 180 rpm bei 37°C als Minikultur inkubiert. Zur Selektion wurde dem Medium abhängig von dem Vektor und dem Bakterienstamm bzw. Plasmid Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol bzw. eine Kombination dieser drei Antibiotika zugesetzt. Zur Lagerung als Glycerinkultur wurden 500 µl der Kultursuspension unter sterilen Bedingungen mit 500 µl Glycerin (50% v/v) gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.9 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Mini- und Maximaßstab)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 ml Schüttelkulturen von *E. coli* wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maximaßstab aus 50-200 ml Schüttelkulturen von *E. coli* wurde mit dem NucleoBond Xtra Maxi Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$, wo das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt (OD_{260}). Als Referenz dient dabei das Lösungsmittel der Nukleinsäure.

Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure wurde der Quotient aus den Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm herangezogen. Ein Quotient von 1,8, zeigt einen hohen Reinheitsgrad an.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die automatische Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977).

Nach Klonierung, Isolierung der rekombinanten Plasmide und Bestätigung der korrekten Fragmentgröße durch Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente sequenziert, um die Richtigkeit ihre Sequenz zu überprüfen. Die Sequenzierung wurde bei GATC (Biotech), Konstanz durchgeführt.

2.2.12 RNA Isolierung aus humanen Zellen und Gehirngewebe

Die Gesamt-RNA wurde aus Zellen mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Unerwünschte DNA wurde durch DNase I-Behandlung entfernt.

Die Gesamt-RNA wurde aus Gehirngewebe mit Hilfe des RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit for fatty tissues nach Herstellerangaben isoliert. Unerwünschte DNA wurde durch DNase I-Behandlung entfernt.

2.2.13 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe des Verso cDNA Kit nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Es wurden Oligo-(dT)-*Primer* verwendet, die spezifisch an den Poly(A)-Schwanz der eukaryontischen mRNA binden. Parallel wurde eine Kontrolle, die ohne Polymerase behandelt wurde (Minus-RT-Kontrolle), mitgeführt.

2.2.14 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Reverse Transkription, gefolgt von einer PCR-Reaktion, ist die Methode der Wahl zur Analyse der mRNA-Expression. Diese Methode, die als qRT-PCR bezeichnet wird, ist hochsensitiv und erlaubt die Quantifizierung von sehr geringen Transkriptmengen wobei auch kleine Veränderungen der Genexpression unterschieden werden können (Pfaffl *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004). Die einfachste Detektionsmethode für das neusynthetisierte PCR-Produkt in der qRT-PCR basiert auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green I in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA. Nach jedem Amplifikationszyklus der qRT-PCR kann so anhand der Fluoreszenz die Amplifikationsmenge bestimmt werden. Alle Ansätze wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei jedem Primerpaar wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt.

| <u>Ansatz</u> | | <u>Programm</u> | |
|----------------------------------|----------|-----------------|--------------|
| Template-cDNA | 20 ng | 15 min bei 95°C | |
| SYBER Green-Mix | 12,5 µl | 15 s bei 95°C | } 40 Zyklen |
| 25 mM dNTPs | 10 µl | 30 s bei 55°C | |
| 10 pmol/µl <i>Primer</i> forward | 1 µl | 30 s bei 72°C | |
| 10 pmol/µl <i>Primer</i> reverse | 1 µl | 120 s bei 40°C | |
| Aqua bidest. | ad 25 µl | 60 s bei 50°C | |
| | | 5 s bei 50-99°C | Schmelzkurve |
| | | kühlen bei 4°C | |

Dieses Protokoll wurde für sämtliche zu untersuchenden Proben verwendet.

Die quantitative Auswertung der qRT-PCR-Daten nach der so genannten Pfaffl-Methode berücksichtigt, dass nur unter optimalen Bedingungen die Produktmenge bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt wird. Der limitierende Faktor ist hierbei die Effizienz der Primer (E). Deshalb mussten zunächst die Primereffizienzen der Primerpaare bestimmt werden. Dazu wurde die cDNA aus allen verwendeten Proben gepoolt und eine Verdünnungsreihe mit 0,02 ng, 0,2 ng, 2 ng, 20 ng und 100 ng cDNA in der qRT-PCR analysiert. Mit Hilfe des Programms RotorGene wurden in einem Diagramm der Logarithmus der Konzentration auf der Abszisse und die C(T)-Werte auf der Ordinate aufgetragen. Die Steigung m der resultierenden Gerade wurde über lineare Regression bestimmt. Über die Steigung m konnte dann die Primereffizienz E nach folgender Formel berechnet werden :

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Für die qRT-PCR wurden nur solche Primer verwendet, deren Effizienz bei mindestens 1,8 lag.

Um eine akkurate relative Quantifizierung vornehmen zu können, wurde die Pfaffl-Methode für die Berechnung der relativen Expressionlevel verwendet. Dabei wurde die Expression des Zielgens relativ zur Expression von Referenzgenen ermittelt. Als Referenzgene dienen nicht-regulierte Gene, so genannte *Housekeeping gene*, deren mRNA-Synthese idealerweise in verschiedenen Geweben stabil und unabhängig von experimentellen Behandlungen ist. Tatsächlich haben jedoch zahlreiche Studien gezeigt, dass auch der Expression von *Housekeeping gene* reguliert wird und in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen variieren kann. Mit Hilfe der folgenden mathematischen Beziehung kann die relative Expression des Zielgens im Vergleich zu den Referenzgenen ermittelt werden:

$$\text{ratio} = \frac{\left(E_{\text{target}}\right)^{\Delta C(t)_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{\left(E_{\text{ref}}\right)^{\Delta C(t)_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Dabei sind E_{target} und E_{ref} die relativen Primer-Effizienzen für das Transkript des Zielgens bzw. des Referenzgens. Die C(T)-Werte der Proben wurden mit Hilfe des Programms RotorGene bestimmt. Dafür wurde die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven ausgewählt, die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz der Zyklen wurde subtrahiert

und der Schwellenwert der Fluoreszenz wurde auf 0,025 gesetzt. Der C(T)-Wert gibt den Zyklus an, an dem die Fluoreszenz in der Probe den Schwellenwert erreicht, wobei umso weniger Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts benötigt wurden, je mehr *Template*-cDNA in der Probe am Anfang der qRT-PCR-Reaktion vorhanden war. Die relative Berechnung der Expression des Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen kompensiert Unterschiede in Qualität und Quantität der cDNA-Proben innerhalb eines Ansatzes. Mögliche Variationen der Genexpression aufgrund der experimentellen Bedingungen, die Ziel- und Referenzgen in gleichem Maße beeinflussen, konnten ebenfalls ausgeglichen werden. Die Expression des Zielgens wurde außerdem relativ zu mehreren Referenzgenen bestimmt, um Fehler bei der Bestimmung der relativen Expression des Zielgens aufgrund möglicherweise vorhandener Regulationsmechanismen der *Housekeeping gene* zu minimieren. Dazu wurden die Expressionsniveaus der Proben ermittelt und auf das geometrische Mittel der *Housekeeping gene* bezogen. In dieser Arbeit wurden β -Aktin, Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase sowie ribosomales Protein L13a als *Housekeeping gene* verwendet.

2.2.15 DNA Isolierung aus Gehirngewebe

Die Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kits nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.16 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Das Vorhandensein des SNPs im Promotor des *HTRAI*-Gens wurde mittels RFLP untersucht, indem das amplifizierte DNA-Fragment mit einem Restriktionsendonucleasen verdaut wurde, welches nur eines der beiden Allele schneiden kann (*EagI*, *BstZI*, *EaeI* und *BsiEI*). Die Restriktionsendonucleasen wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 3 h und wurde anschließend mittels QIAprep Spin PCR purification Kit gereinigt. Die Restriktionsfragmente wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Fragmentgröße konnten die vom Enzym geschnittenen, bzw. nicht geschnittenen Fragmente identifiziert werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Erzeugung großer Mengen eines bestimmten Proteins werden häufig bakterielle Expressionssysteme verwendet. Das am häufigsten genutzte Bakterium *E. coli* bietet durch seine unkomplizierte Kultivierung und durch die mögliche Verwendung starker induzierbarer Promotoren eine einfache Möglichkeit der Überproduktion rekombinanter Proteine.

Die DNA des gewünschten Proteins bzw. Proteinfragments wurde hierzu in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Der verwendete pET-Vektor besitzt den T7 Promotor. Im uninduzierten Zustand bindet ein spezifischer Repressor an den Operator des Promotors und blockiert die Expression des Gens. Die Induktion des Systems kann durch verschiedene Galactoside (z. B. Lactose, Allolactose und IPTG) erfolgen. In den vorgenommenen Experimenten wurde IPTG als Induktor verwendet. IPTG bindet an den Repressor, was die Dissoziation vom Operator zur Folge hat und die Expression des Gens ermöglicht.

Eine Vorkultur wurde aus einer einzelnen Kolonie nach der Transformation angesetzt (über Nacht, 37°C). Ausgehend von dieser Vorkultur (5 ml) wurde eine Übernacht-Kultur (200 ml NZA-Medium) bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 4 l NZA-Medium mit der Übernacht-Kultur angeimpft, bis eine OD₆₀₀ von 0,05 zu messen war. Anschließend wurde die Kultur bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Bei dieser OD₆₀₀ befand sich die Bakterienpopulation in ihrer logarithmischen Wachstumsphase und war für die Induktion rekombinanter Proteine geeignet. Zur Kontrolle wurde ein entsprechendes Aliquot nicht induzierter Bakterienkultur vom Ansatz entnommen. Anschließend wurde die Expression durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5-1 mM) induziert. Die Kultur wurde für 5 h bei 25°C (bei der HtrA1 Reinigung) oder für 3h bei 37°C (bei der tau Reinigung) geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 15 min) geerntet. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in eiskaltem Lysispuffer-A bzw. Lysispuffer-B resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.2 Präparativer Aufschluss von Bakterienzellen

Für den Aufschluss wurden die Zellen bei 4°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 10 min). Das Pellet wurde in eiskaltem Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgt mit Hilfe eines M-100L Microfluidizer Processors. Hierbei wurden die Zellen mit etwa 12 bar durch eine Kapillare gepresst, wobei sie aufgrund der hohen Scherkräfte aufbrachen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, um einen möglichst vollständigen Aufschluss zu gewährleisten.

2.3.3 Reinigung von His-HtrA1 aus *E. coli* BL21 (D3 plus) Rosetta

Das HtrA1-Protein wurde aus dem Stamm BL21 (D3 plus) Rosetta gereinigt. Dieser Stamm besitzt erhöhte Mengen seltener *E. coli* t-RNAs, die für die Überexpression rekombinanter, humaner Proteinen von besonderer Bedeutung sind.

Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Sedimentation der Zelltrümmer (25000 rpm, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde auf die mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule aufgetragen (Flußrate: 3 ml/min). Nicht bindende Proteine wurden mit 150 ml Waschpuffer-A I eliminiert (Flußrate: 3 ml/min). In einem zweiten Waschschrift wurden unspezifisch bindende Proteine mit 150 ml Waschpuffer-A II, der 30 mM Imidazole enthielt, entfernt (Flußrate: 3 ml/min). Das gebundene Protein wurde mit Elutionspuffer-A eluiert, dieser enthielt 150 mM Imidazol (Flußrate: 3 ml/min). Die eluierten Fraktionen wurden auf ihren Reinheitsgrad hin mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Da der Reinheitsgrad von HtrA1 noch nicht ausreichend war, wurde ein weiterer Reinigungsschritt über eine Hydroxyapatitsäule (HPS) durchgeführt.

Die HPS-Säule wurde mit dem Anfangspuffer-A äquilibriert. Danach wurde das Eluat der Ni-NTA Säule auf die HPS-Säule aufgetragen (Flußrate: 3 ml/min). Um nicht bindende Proteine zu eliminieren, wurde die Säule mit 100 ml Anfangspuffer-A gewaschen (Flußrate: 3 ml/min). Das gebundene Protein wurde mit einem Phosphatgradienten aus Anfangs- und Endpuffer-A (0-100% in ca. 500 ml) eluiert (Flußrate: 4 ml/min). Die Proteine eluierten bei einer Phosphatkonzentration von 150 bis 200 mM. Bei Bedarf wurden die Proben über Vivaspin-Röhrchen (30 kDa) aufkonzentriert.

Vor der Lagerung der Proteine wurden diese dreimal bei 4°C für 45 min in Dialysepuffer dialysiert. Die Reinigung wurde mittels Coomassiefärbung und Western-Blot kontrolliert.

Die Hauptfraktionen der Reinigung wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Diese Proteine wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.4 Reinigung von tau-Proteinen aus *E. coli* BL21 (D3 plus) Rosetta

Proteine, ohne ausgeprägte Sekundärstruktur, fallen in kochendem Wasser nicht aus und können somit von Proteinen mit Sekundärstruktur getrennt werden. Das tau-Protein besitzt keine ausgeprägte Sekundärstruktur, deshalb wurde wt-tau, PHP-tau und Ala-tau über dieses Verfahren gereinigt (Romero *et al.*, 2001).

Das PHP-tau- und Ala-tau-Protein unterscheidet sich von dem wt-tau-Protein durch den Austausch von 10 Serin/Threonin-Resten gegen Glutamat bzw. Alanin. Bei den ausgetauschten As handelt es sich um die As 140, 141, 144, 173, 177 in der Prolinreichen Region und um die As 307, 315 320, 324, 333 am C-Terminus des Proteins.

Die Proteine wurden aus dem Stamm *E. coli* BL21 (D3 plus) Rosetta gereinigt. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Sedimentation der Zelltrümmer (25000 rpm, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aliquotiert und in einem Wasserbad für 20 min gekocht. Die Proteine, die eine Sekundärstruktur aufwiesen, sind nach kürzester Zeit ausgefallen, was anhand eines weißen Niederschlages ersichtlich wurde. Bei einem anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die ausgefallen Proteine von den noch löslichen getrennt (35000 rpm, 4°C, 40 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Reinheit der tau-Proteine wurde durch ein SDS-Gel mit Coomassiefärbung ermittelt. Da der Reinheitsgrad der tau-Proteine noch nicht ausreichend war, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels Ammoniumsulfatfällung durchgeführt.

Proteine können bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen gefällt werden. Die spezifische Konzentration muss zunächst durch einen Vorversuch ermittelt werden. Das tau-Protein wird bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 40% gefällt.

Zu dem aufgekochten Proteinlysate wurde Ammoniumsulfat eingewogen, so dass eine 30% Lösung entstand. Das Lysat wurde 30 min bei 15°C auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (30 min, 30000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und es wurde eine Ammoniumsulfatkonzentration von 40% eingestellt, erneut für 30 min geschüttelt und für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Lagerungspuffer aufgenommen. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE

und Western-Blot kontrolliert. Die Proteine wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Sie wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde ein Bradford-Microassay verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Es wurden 1-5 µl Proteinlösung mit 49-45 µl Aqua dest. und 200 µl Bradford Reagenz (Roti-Nanoquant) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Probe bei 595 nm im Spektralphotometer Smart Spec Plus gemessen. Anhand einer zuvor hergestellten Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen (1-15 µg BSA) wurde dann die Konzentration der zu analysierenden Probe ermittelt.

2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Shapiro *et al.*, 1967; Laemmli, 1970) benutzt.

Proteinproben wurden mit SDS und DTT-haltigem 4x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min aufgekocht. Durch die Behandlung der Proteine mit SDS erhalten diese ein ungefähr gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis und weisen eine ähnliche Form auf, was bei der Trennung ausgenutzt wird. Die Zugabe von DTT führt zu einem Aufbruch der Disulfidbrücken. Die Proteine können dann im SDS-Gel nach ihrer molaren Masse aufgetrennt werden.

Die Proteine wurden zunächst im 2,5%igen Sammelgel auf eine Laufhöhe gebracht. Anschließend fand eine Auftrennung der Proteine in einem 10%igen oder 12%igen Trenngel statt (Tab. 2. 9). Die Acrylamidgele wurden zunächst bei 150 V für 15 min und anschließend bei 180 V für 1 h in Elektrophoresepuffer laufen gelassen. Als Größenvergleich dienten Proteinstandards.

Tab. 2. 9 Zusammenstellung von Sammel- und Trenngel

| | 2,5% Sammelgel | 10% Trenngel | 12% Trenngel |
|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| H ₂ O | 6,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| Acrylamidlösung 30% | 1,1 ml | 3,3 ml | 4 ml |
| Sammelgelpuffer | 2,5 ml | - | - |
| Trenngelpuffer | - | 3,2 ml | 3,5 ml |
| APS 10% | 80 µl | 50 µl | 50 µl |
| TEMED | 40 µl | 20 µl | 20 µl |

2.3.7 Coomassie-Blau Färbung

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten durch Coomassie-Blau angefärbt werden. Zunächst wurde das Gel für 1 min in Coomassie-Puffer I in der Mikrowelle erhitzt (400 W) und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Gel jeweils 1 min in der Mikrowelle (400 W) mit Coomassie-Puffer II und III erhitzt und in Coomassie-Puffer IV für 1 h entfärbt.

2.3.8 Western-Blot

Unter *Blotting* versteht man den elektrophoretischen Transfer von Makromolekülen aus einem Gel auf eine Membran. Der Transfer von zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wird Western-Blot genannt (Renart *et al.*, 1979) und erlaubt spezifische Nachweisreaktionen von auf der Membran immobilisierten Proteinen.

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert, um eine Analyse der Proteine mit Hilfe von Antikörpern durchführen zu können. Vor dem Transfer der Proteine wurden das Trenngel und Filterpapier in Blottingpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde im ersten Schritt in 100% Methanol für einige Sekunden aktiviert, im zweiten Schritt für 5 min in H₂O inkubiert und im dritten Schritt für 15 min in Transferpuffer äquilibriert.

Der Elektrotransfer wurde 1 h bei 100 V durchgeführt. Um zu sehen, ob der Transfer erfolgreich war, wurde die Membran für wenige Sekunden in Ponceau S Rot-Lösung

geschwenkt und anschließend für ca. 10 min in dest. H₂O gewaschen. Die Proteine wurden hierbei unspezifisch rot gefärbt. Der spezifische Nachweis einzelner Proteine wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen den fusionierten Tag oder gegen das Protein erbracht. Hierzu wurde im ersten Schritt die Membran in 10% (w/v) Magermilch (in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt.

Der verwendete Sekundärantikörper erkannte die konstante Region des Primärantikörpers. Es wurde ein Sekundärantikörper verwendet der entweder mit Alkalischer Phosphatase oder mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen.

Bei Verwendung eines mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Zweitantikörpers, wurde die Membran für 5 min in AP-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde mit einer AP-Färbelösung gefärbt. Die Färbung wurde ungefähr nach 10 min durch Waschen der Membran mit Wasser beendet.

Bei Verwendung eines mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers, wurde die Membran mit TBS für 5 min äquilibriert. Anschließend wurde das Substrat (ECL plus Western-Blot Detection System) auf die Membran gegeben. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Diese Reaktion verläuft unter Aussendung von Licht. Die Chemolumineszenzsignale wurden mit Hilfe einer Fotoeinheit detektiert.

2.3.9 Spaltung von pNA-Substraten durch HtrA1

Die proteolytische Aktivität der Proteasen kann durch Peptide, die eine C-terminal gekoppelte p-Nitroanilin-Gruppe (pNA) tragen, bestimmt werden. Die Spaltung muss hierfür zwischen der p-NA-Gruppe und der damit verknüpften As erfolgen. Die Menge des freigesetzten p-NA ist ein Maß für die Proteaseaktivität und kann photometrisch quantifiziert werden. Die für eine Bestimmung der proteolytischen Aktivität von HtrA1 verwendeten pNA-Peptide sind in Tab. 2. 8 aufgeführt. Die zu testenden Peptide wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt. Für den Test wurden 5 µg gereinigtes HtrA1 verwendet. Je nach Versuchsanordnung wurden

ebenfalls aktivierende oder inhibierende Substanzen zugegeben und mit dem Protein vorinkubiert. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer auf 100 µl aufgefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm kontinuierlich bei entsprechender Temperatur für 2 h gemessen. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten beruhen auf mindestens drei Doppelbestimmungen.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta A_{405} * V}{c * \epsilon * t} \text{ (mol * mg}^{-1} * \text{min}^{-1}\text{)}$$

ΔA_{405} : Absorptionsänderung bei $\lambda = 405$ nm über den Messungszeitraum

V: Endvolumen des Reaktionsansatzes [ml]

c: Konzentration von HtrA1 im Reaktionsansatz [mg/ml]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient des pNAs [$8.800 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$]

t: Messzeit [min]

2.3.10 Abbau von tau durch HtrA1

Um zu testen, ob es sich beim tau-Protein (wt-tau, PHP-tau, Ala-tau) um ein Substrat von HtrA1 handelt, wurde tau und HtrA1 mit einer Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 und 50:1 inkubiert. Hierfür wurden 1 µg tau-Protein mit 0,1 µg HtrA1 bzw. 1 µg tau-Protein mit 0,2 µg HtrA1 bei 37°C in Reaktionspuffer inkubiert. Es wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine Probe entnommen und der Verdau und die entstehenden Abbauprodukte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.3.11 Tau Cross-Link und anschließender Abbau durch HtrA1

Verschiedene Substanzen sind in der Lage, Proteine quervernetzen (Cross-Linken). Handelt es sich bei dem Cross-Linker um Formaldehyd, dann kann die Aldehydgruppe mit Stickstoff und/oder einem anderen Atom des Proteins einen Cross-Link eingehen. Es bildet sich eine $-\text{CH}_2-$ Brücke. Bei Formaldehyd handelt es sich um einen geeigneten Cross-Linker für das tau-Protein. Bei Inkubation von tau mit Formaldehyd, entstehen in kürzester Zeit große Aggregate (Nie *et al.*, 2007a; Nie *et al.*, 2007b).

Um aggregierte Zustände des tau-Proteins zu erreichen, wurden 30 µg wt-tau, PHP-tau oder Ala-tau mit 1% (v/v) Formaldehyd in einem Cross-Linking-Puffer für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Aggregate mit 40% (v/v) Ammoniumsulfat gefällt, um sie vom restlichen Formaldehyd zu befreien. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (30 min, 30000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in Reaktionspuffer aufgenommen und eine Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 wurde eingestellt. Hierfür wurden 30 µg tau-Protein mit 3 µg HtrA1 über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde aggregiertes tau ohne HtrA1 in Reaktionspuffer inkubiert. Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 50°C. Anschließend wurde eine elektrophoretische Auftrennung der Proben mittels NuPAGE Novex Midi Gel in NuPAGE-Elektrophoresepuffer durchgeführt. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Als Größenvergleich diente der HiMark™ Prestained HMW Proteinstandard.

2.3.12 Abbau von PHFs durch HtrA1

Die PHFs wurden mit dem Sonifizierer (Sonoplus HD2200) sonifiziert. Eine Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 wurde analysiert. Der Verdau wurde bei 37°C in Reaktionspuffer durchgeführt. Die PHFs wurden für 5 h und über Nacht mit HtrA1 inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an PHFs ohne HtrA1 unter den gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert. Zu den Proben wurde 4x SDS-Probepuffer zugegeben und sie wurden bei 99°C für 5 min aufgekocht. Der Verdau wurde mittels Western-Blot analysiert.

2.3.13 Extraktion von Proteinen aus Gehirngewebe

In Gehirngewebe von AD Patienten findet man senile Plaques und neurofibrilläre Bündel. Damit Proteine aus diesen Ablagerungen isoliert werden können, muss das Gehirngewebe mit Ameisensäure behandelt werden (Kienlen-Campard *et al.*, 2002).

Die Gehirngewebe wurden bei -80°C gelagert. Aus dem noch gefrorenen Gehirngewebe wurde eine Probe aus dem Kortex entfernt und 100 mg wurden abgewogen. Die Gewebeprobe wurde in 800 µl THB-Puffer gemischt und sonifiziert (3 x 30 s, 1 min Pause dazwischen). Anschließend wurde die Probe für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden

300 µl der Probe mit 700 µl 70% (v/v) Ameisensäure vermischt und erneut sonifiziert (2 x 30 s, 1 min Pause dazwischen). Es folgte ein Zentrifugationsschritt (35000 rpm, 4°C, 1 h), bei dem sich drei Schichten bildeten. Die oberste Schicht war eine Fettschicht, die mittlere Schicht enthielt die Proteine und die Ameisensäure und das Pellet am Boden. Die mittlere Schicht wurde vorsichtig entnommen und 200 µl Probe wurde mit 3000 µl Neutralisierungspuffer gemischt. Die Proben wurden entweder direkt für einen ELISA verwendet oder aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.14 HtrA1-ELISA

Für die quantitative Analyse von HtrA1 aus Zellüberstand oder Gehirnextrakt wurde ein *sandwich* ELISA durchgeführt. Der ELISA hat den Vorteil gegenüber dem Western-Blot, dass er quantitativ ist und eine höhere Sensitivität aufweist.

Der monoklonale HtrA1-Antikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt. Je 100 µl dieser Verdünnung wurden in eine Vertiefung einer ELISA-Vertiefungsplatte gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die mit dem monoklonalen Antikörper inkubierte ELISA-Platte viermal mit PBS-T gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die ELISA-Platte durch Ausklopfen auf ein saugfähiges Tuch von Flüssigkeitsresten befreit. In jede Vertiefung wurden 300 µl 3% BSA Lösung gegeben und die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde eine Eichgerade mit gereinigtem HtrA1 bekannter Proteinkonzentration (0,3-100 ng/ml HtrA1) hergestellt.

Der Waschvorgang wurde wiederholt und anschließend wurden der HtrA1-Standard und die Proben auf die Platte gegeben. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung zu je 100 µl analysiert. Alle Kontrollen wurden auf der gleichen ELISA-Platte analysiert, auf der sich auch die Proben befanden. Als Kontrolle wurden 3% (w/v) BSA in PBS, Lysispuffer oder Medium analysiert. Die Platte wurde abgedeckt und auf einem Schüttler inkubiert (300 rpm, 30°C, 2 h). Ein weiterer Waschschrift folgte und danach wurde polyklonaler HtrA1-Antikörper aus Kaninchen 1:500 verdünnt in 1% (w/v) BSA/PBS zu je 100 µl auf die Platte gegeben und inkubiert (300 rpm, 30°C, 1 h). Die Platte wurde erneut gewaschen und mit 100 µl Biotin gekoppelten Sekundärantikörper 1:5000 verdünnt in 1% (w/v) BSA/PBS inkubiert (300 rpm, 30°C, 1 h). Ein erneuter Waschschrift folgte und es

wurden 100 µl Streptavidin-HRP 1:500 verdünnt in 1% (w/v) BSA/PBS zugegeben (300 rpm, Raumtemperatur, 30 min). Während dieser Zeit wurde 0,025 g TNB abgewogen und erst in 0,5 ml DMSO und anschließend in 0,5 ml Ethanol gelöst. Danach wurde die TNB-Lösung in Galattipuffer 1:100 verdünnt. Nach dem waschen der Platte wurden 100 µl TNB-Galattipuffer-Lösung auf die Platte gegeben und unter Schütteln und Lichtausschluss inkubiert (300 rpm, Raumtemperatur, 10-30 min). TMB dient hierbei als Chromogen und reagiert mit der Peroxidase unter Bildung eines blauen Endprodukts. Das Stoppen dieser Reaktion erfolgt über die Zugabe von 50 µl Stopplösung. Durch die Zugabe der Stopplösung veränderte sich die Farbe und ein stabiler gelber Farbkomplex wurde gebildet. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens, hier dem humanen HtrA1, und kann bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden.

2.3.15 Aβ42/40-ELISA

Für die Konzentrationsbestimmung von Aβ40 oder Aβ42 in menschlichem Gehirngewebe wurde ein für Aβ40- oder Aβ42-spezifischer enzymgekoppelter Immunadsorptionstest nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.16 Tau/TauP-369 ELISA

Für die Konzentrationsbestimmung von tau oder tauP-396 in menschlichem Gehirngewebe wurde ein für tau- oder tauP-396-spezifischer enzymgekoppelter Immunadsorptionstest nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen in Begasungsbrutschränken bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre.

In Tab. 2. 10 sind die Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien beschrieben.

Tab. 2. 10 Kulturbedingungen verschiedener Zelllinien

| Zelllinie | Medium | Serum | Antibiotikum | Passage | Verdünnung |
|------------------|---------------|---------------------------|---------------------|----------------|-------------------|
| HEK-293T | DMEM | 10% FCS | 1% Pen./Strep. | alle 2-3 Tage | 1:10 |
| PC12 | DMEM | 10% FCS 5% Pferdeserum | 1% Pen./Strep. | alle 3-4 Tage | 1:4 |
| U373-MG | DMEM | 10% FCS | 1% Pen./Strep. | alle 3-4 Tage | 1:5 |

2.4.2 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff oder bei -150°C gelagerten Zellen wurden auf Eis transportiert. Nach zügigem Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen in ein steriles Kulturröhrchen mit 1 ml eiskaltem Medium überführt und nach 1 min mit weiteren 8 ml Medium verdünnt. Nach Zentrifugation bei 1100 rpm für 5 min wurde der Mediumüberstand abgenommen. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 6 ml Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in eine T25-Kulturflasche überführt.

2.4.3 Zellpassage

Die kultivierten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% passagiert. Hierzu wurden die U373-MG und HEK-293T Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für einige min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit frischem Medium vom Boden der Kulturflasche gespült, je nach Zellart 1:4-1:10 verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Die PC12 Zellen wurden nicht mit Trypsin/EDTA behandelt, sondern nur durch Spülen mit frischem Medium vom Boden gelöst.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde ein Tropfen der Zellsuspension unter ein Deckglas pipettiert, das zuvor auf der Zählkammer positioniert wurde. Es wurden die vier äußeren der neun großen Quadrate des Zählnetzes ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl/ml ergab sich aus dem Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10^4 .

2.4.5 Kryokonservierung von Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl/ml wurden jeweils 2×10^6 Zellen pro Kryogefäß eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in einem Falcon-Röhrchen zunächst bei 1100 rpm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Medienüberstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend vorsichtig mit 0,5 ml FCS resuspendiert. Danach wurden 0,5 ml 20% DMSO/80% FCS zugetropft, so dass eine Endkonzentration von 10% DMSO/90% FCS entstand. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox für drei Tage bei -80°C eingefroren. In dieser Box war ein kontinuierliches Abkühlen der Zellen um 1°C/min gewährleistet. Abschließend wurden die Kryogefäße auf Trockeneis transportiert und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff oder bei -150°C gelagert.

2.4.6 Transfektion von Säugerzellen mit Jet-Pei™

Um rekombinante Gene in eukaryotischen Zellen zu exprimieren werden diese mit Plasmiden transient transfiziert. Die Wahl der Transfektionsmethoden ist dabei von der Zelllinie abhängig. Die Übertragung der HtrA1-Cherry-Expressionsvektoren in die U373-MG Zellen erfolgte unter Verwendung des kationischen Polymer-Transfektionsreagenz Jet-Pei™ nach Anleitung des Herstellers. Die eingesetzte Zellzahl variierte zwischen $0,1 \cdot 10^6$ bis $0,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Für einen Transfektionsansatz wurde eine DNA-Menge von $3 \mu\text{g/ml}$ Zellsuspension eingesetzt. Eine Kotransfektion mit dem tau-GFP Expressionsvektors ermöglichte Kolokalisationsstudien von HtrA1-Cherry und tau-GFP im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Bei einer Kotransfektion wurden $1,5 \mu\text{g}$ von jedem Plasmid gemischt. Anschließend wurden die Plasmide für 25 min mit der Transfektionsreagenz inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben, um sie zu transfizieren.

2.4.7 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Die auf Deckgläser gewachsenen Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann für 10 min mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Danach wurde dreimal kurz mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 0,1% Triton-X 100 in PBS für 10 min zur Permeabilisierung der Zellmembran. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurde für 1 h mit 1% (w/v) BSA in PBS inkubiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Zur Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Deckgläser aus den Vertiefungen der 6-Vertiefungsplatte entnommen, durch Tupfen mit der Kante auf einem Stück Zellstoff von überschüssigem PBS befreit und in eine saubere 6-Vertiefungsplatte überführt. Anschließend wurden 100 - 150 μl der Antikörperlösung vorsichtig mit einer Pipette aufgetropft. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser dreimal kurz, sowie dreimal für 20 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur wie oben beschrieben. Alle Antikörper und Zusatzfarbstoffe wurden in 1% BSA (w/v)-haltigem PBS gelöst. Wenn der Kern gefärbt wurde, enthielt die Zweitantikörperlösung den DAPI-Farbstoff, für eine Färbung von Aktin wurde Alexa-488-gekoppeltes Phalloidin aus *Amanita phalloides* (0,1 mg in Methanol) verwendet.

Nach gründlichem Waschen mit PBS (mindestens viermal für 20 min) wurden die Deckgläser abschließend mit einem luftblasenfreien Tropfen Prolong Gold (ca. 30 µl) auf Objektträgern eingebettet und über Nacht abgedunkelt an der Luft getrocknet. Während des gesamten Arbeitsganges wurden die Präparate vor Lichteinfall geschützt. Die Immunfluoreszenz wurde mit einem Konfokal-Mikroskop (Leica TCS-SP5) ausgewertet. In Tab. 2. 11 sind die Verdünnung der Antikörper und Farbstoffe beschrieben.

Tab. 2. 11 Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

| Antikörper | Verdünnung | Art |
|----------------------------------|-------------------|------------|
| α -Tubulin | 1:200 | primär |
| α -Kaninchen Alexa 488 | 1:500 | sekundär |
| Alexa-488-Phalloidin (0,1 mg/ml) | 1:500 | Farbstoff |
| DAPI | 1:20000 | Farbstoff |

2.4.8 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (*Laser Scanning Confocal Microscopy*, LCSM) erreicht eine deutlich höhere optische Auflösung im Vergleich zu der Durchlicht- und der Epifluoreszenzmikroskopie. Letztere sind in der optischen Auflösung dadurch limitiert, dass sie das Objekt als Ganzes ausleuchtet und damit zur Unschärfe beitragende Bildinformation von oberhalb und unterhalb der Fokusebene in die Abbildung integriert. Die LCSM zeichnet sich dadurch aus, dass es mit Hilfe von Blenden und Spiegeln das Licht auf einen punktförmigen Bereich in der Probe fokussiert.

Mit Hilfe der LCSM wurden Aufnahmen von lebenden oder fixierten Zellen durchgeführt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Konfokalen-Mikroskop (Leica TCS-SP5) standen bis zu sechs verschiedene Kanäle zur Verfügung, so dass mehrere Fluoreszenzsignale im identischen Präparat simultan oder sequentiell abgerastert und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden konnten. Als Lichtquelle wurde ein Laser verwendet, der sich aufgrund seines linienförmigen Spektrums besonders zur Bereitstellung einer für ein gegebenes Fluorophor benötigten Anregungswellenlänge eignete. Für diese Arbeit wurden Dioden-Laser, Argon-Laser, und zwei Helium-Neon-Mischgaslaser eingesetzt, deren

Hauptemissionslinien bei 405 nm, 488 nm, 543 nm und 633 nm liegen. Alle Proben wurden mit dem 63 × Öl-Objektiv aufgenommen.

2.4.9 Behandlung von Zellen mit tau-Proteinen

Der Einfluss von tau-Proteinen auf die HtrA1-Expression wurde wie folgt analysiert. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden in einer 6-Vertiefungsplatte ausgesät (U373-MG $0,25 \times 10^5$, PC12 4×10^5 , HEK-293T 1×10^5). Nach drei Tagen wurden unterschiedliche Mengen an tau-Protein in den Überstand der Zellen gegeben (0,1-10 µg/ml tau-Protein). Nach verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h) wurde der Überstand abgenommen und im ELISA getestet. Außerdem wurde mittels qRT-PCR die HtrA1-RNA-Menge von HtrA1 in den Zellen bestimmt.

2.4.10 Lentivirale Transduktion von eukaryotischen Zellen

Lentiviren integrieren effizient in das Genom proliferierender Zellen. Für die lentivirale Transduktion der Zielzellen wurde zunächst die Verpackungszelllinie HEK-293T mit Hilfe der CaCl_2 -Methode mit dem Lentivektor und den Hilfsvektoren kotransfiziert. Dazu wurden am ersten Tag HEK-293T Zellen auf eine 10 cm-Schale überführt, so dass sie am nächsten Tag 50% Konfluenz waren. Eine 10 cm-Schale HEK-293T Zellen ergab 10 ml Virusüberstand, welcher für vier 3 cm-Schalen ausreichte. Es wurden 62 µl 2 M CaCl_2 -Lösung mit den entsprechenden Vektoren gemischt und es folgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung in das Medium der HEK-293T Zellen gegeben.

Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zielzellen. Für die Infektion der Zielzellen wurde der virushaltige Überstand der transfizierten Verpackungszellen abgenommen, durch Sterilfiltration (Porengröße 0,45 µm) von Zellresten befreit und nach Zugabe von 10 µl Polybren zu den mit PBS gewaschenen Zielzellen gegeben. Die Zielzellen wurden dann bei 32°C im Inkubator über Nacht inkubiert. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurde die Infektion wiederholt. Dazu wurden die Verpackungszelllinien weitere 24 h mit Medium versehen, um erneut virushaltiges Medium zu erhalten.

Nach der zweiten Infektion wurden die Zielzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit

Medium versehen und zwei Tage zur Regeneration bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Bestimmung der Transduktionseffizienz wurden 96 h nach Beginn der zweiten Transduktion die Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pRRLU6 CPPT pSK GFP transduziert wurden, mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Ansatz

| | |
|--------------------|-----------|
| pCMVΔR8.2 | 12 µg |
| pHIT G | 6 µg |
| Konstrukt | 12 µg |
| ddH ₂ O | ad 438 µl |

2.4.11 Retrovirale Transduktion von eukaryotischen Zellen

Retroviren integrieren effizient in das Genom proliferierender Zellen. Die retrovirale Transduktion der Zielzellen wurde wie die lentivirale Transduktion durchgeführt (2.4.10). Es wurden lediglich andere Vektoren verwendet. Um die Transduktionseffizienz zu ermitteln, wurde mit dem Kontrollplasmid MP7171-iGFP transduziert.

Ansatz

| | |
|--------------------|-----------|
| pHIT 60 | 12 µg |
| pHit G | 6 µg |
| Konstrukt | 12 µg |
| ddH ₂ O | ad 438 µl |

2.4.12 Selektion

Vor der Transduktion wurde eine Verdünnungsreihe der Zielzellen und dem Selektions-Antibiotikum (hier Puromycin) angesetzt, um die letale Dosis für nicht transduzierte Zellen auszutesten. Nach Umsetzen der transduzierten Zellen wurde mit der Selektion begonnen. Dazu wurde zunächst mit einer niedrigen Konzentration begonnen und dann die Konzentration im Abstand von zwei Tagen bis zum Erreichen der letalen Dosis gesteigert. In Tab. 2. 12 ist die Selektionsbedingung für transduzierte PC12 Zellen beschrieben.

Tab. 2. 12 Selektionsbedingungen für transduzierte PC12 Zellen

| Zelllinie | Selektionsantibiotikum | Konzentration |
|------------------|-------------------------------|----------------------|
| PC12 | Puromycin | 1,4 µg/ml |

3. Ergebnisse

3.1 Ist HtrA1 eine tau Protease?

Die Alzheimersche Krankheit (AD) ist gekennzeichnet durch neurodegenerative Ablagerungen in unterschiedlichen Gehirnarealen. Es können zwei Arten von Proteinablagerungen unterschieden werden: die extrazellulären senilen Plaques und die intrazellulären neurofibrillären Bündel. Die extrazellulären senilen Plaques bestehen hauptsächlich aus dem A β -Peptid, wohingegen der Hauptbestandteil der intrazellulären neurofibrillären Bündel das hyperphosphorylierte tau-Protein ist (1.1).

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die hochkonservierte humane HtrA1 Serinprotease A β Monomere und A β Oligomere abbauen kann (Grau *et al.*, 2005). In der Literatur sind weitere Proteasen beschrieben, die das A β -Peptid und seine Aggregate eliminieren können. Interessanterweise konnte eine gleichwertige tau Protease nicht identifiziert werden (1.3.2). Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob das tau-Protein ein Substrat von HtrA1 ist und ob HtrA1 eine mögliche Rolle in der Protein-Qualitätskontrolle bei AD spielt.

3.1.1 Reinigung von HtrA1

Um die Bedeutung von HtrA1 für den Abbau von tau zu studieren, wurden Protease und Substrat gereinigt und die proteolytische Aktivität von HtrA1 wurde analysiert.

Basierend auf dem Protokoll von Grau *et al.* (Grau *et al.*, 2005) wurde eine verkürzte Form des HtrA1-Proteins aus *E. coli* gereinigt. Da diese verkürzte Variante *in vivo* nachweisbar ist kann sie ebenfalls als natives HtrA1-Protein angesehen werden (Chien *et al.*, 2006).

Das HtrA1-Protein wurde zunächst via Affinitätschromatographie (Ni-NTA) und anschließend mittels Hydroxyapatitsäule (HPS) gereinigt (2.3.3). Von den Reinigungsschritten wurden Proben entnommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

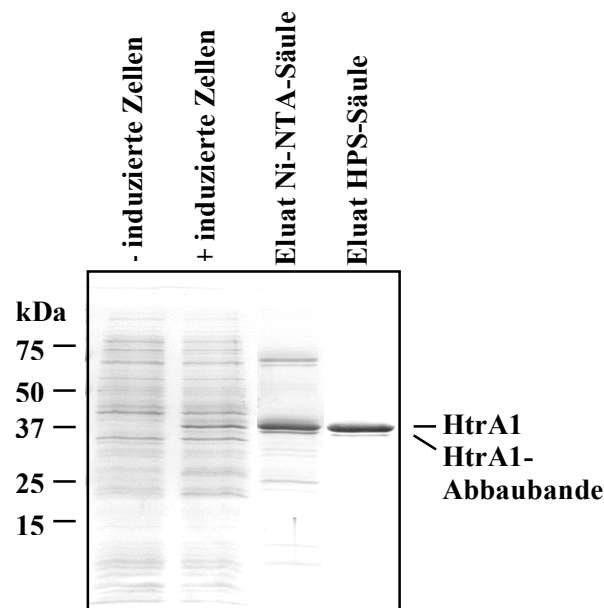


Abb. 3. 1 Überproduktion und Reinigung von HtrA1 aus *E. coli*

Für die Reinigung von HtrA1 wurde das pET-HtrA1 Plasmid in BL21 (D3 plus) Rosetta Zellen transformiert und die Zellen wurden bei 37°C kultiviert. Die Expression von HtrA1 erfolgte nach der Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM für 5 h bei 25°C. Anschließend wurde die Reinigung von HtrA1 mit Hilfe einer Ni-NTA- und einer HPS-Säule durchgeführt. Die Auftrennung von jeweils 2 µg Protein erfolgte durch ein 12%-iges SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Anfärbung durch Coomassie-Blau.

In Abb. 3. 1 ist gezeigt, dass HtrA1 nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem SDS-Gel bei seinem theoretischen Molekulargewicht von 37 kDa nachgewiesen werden konnte. Kurz unterhalb der nativen Bande wurde eine Abbaubande von HtrA1 nachgewiesen. Die Abbaubande und die Reinigung von HtrA1 wurden mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PDZ-HtrA1 und gegen His-Tag verifiziert (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Reinigung von tau

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine Hyperphosphorylierung des tau-Proteins zu den Hauptmerkmalen von AD zählt (Lee *et al.* 1991, Iqbal und Grundke-Iqbal 1996). Um HtrA1 als wirksame tau Protease zu charakterisieren, sollte die Protease nicht nur in der Lage sein natives, sondern auch hyperphosphoryliertes tau abzubauen. Für diese Charakterisierung wurde neben dem nativen tau-Protein (wt-tau¹) eine pseudohyperphosphorylierte-Variante (PHP-tau¹) gereinigt, bei welcher Serin/Threonin-Reste gegen Glutamat ausgetauscht wurden, um eine Hyperphosphorylierung nachzuahmen. Als Kontrolle wurde eine weitere tau-Variante gereinigt, bei welcher die gleichen Serin/Threonin-Reste gegen Alanin (Ala-tau¹) ausgetauscht wurden (Abb. 3. 2).

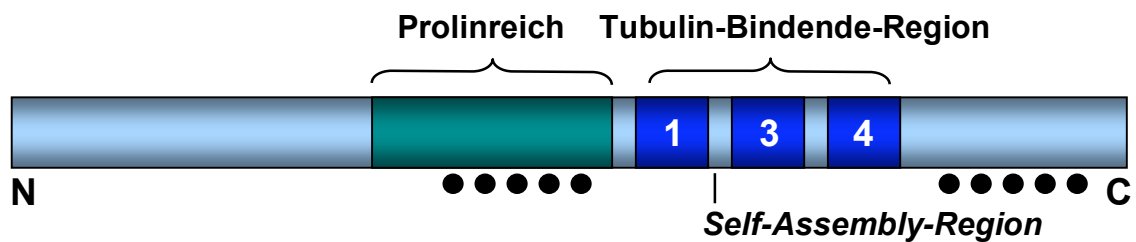


Abb. 3. 2 Schematische Darstellung des PHP-tau-Proteins

Darstellung des PHP-tau-Proteins mit der Prolinreichen-Region und der Tubulin-Bindenden-Region. Innerhalb der Tubulin-Bindenden-Region befinden sich, in der hier dargestellten kleinsten Isoform des tau-Proteins, drei *Repeats*. Das *Repeat 2* ist in der kleinsten Isoform nicht vorhanden. Zwischen dem *Repeat 1* und 3 befindet sich die *Self-Assembly-Region*, welche maßgeblich an der Aggregation des Proteins beteiligt ist. Der N-Terminus (N) und der C-Terminus (C) des Proteins sind dargestellt. Die schwarzen Punkte unterhalb der Sequenz zeigen die Position des Austausches von Serin/Threonin-Reste gegen Glutamat bzw. Alanin an (As: 140, 141, 144, 173, 177 innerhalb Prolinreichen-Region; As: 307, 315 320, 324, 333 innerhalb des C-Terminus).

In *E. coli* überexprimierte tau-Proteine wurden mittels Erhitzen bei 99°C und anschließender Fällung mit 40% Ammoniumsulfat gereinigt (2.3.4). Von den Reinigungsschritten wurden Proben entnommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

¹ Plasmide freundlicherweise von Prof. Brandt, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt

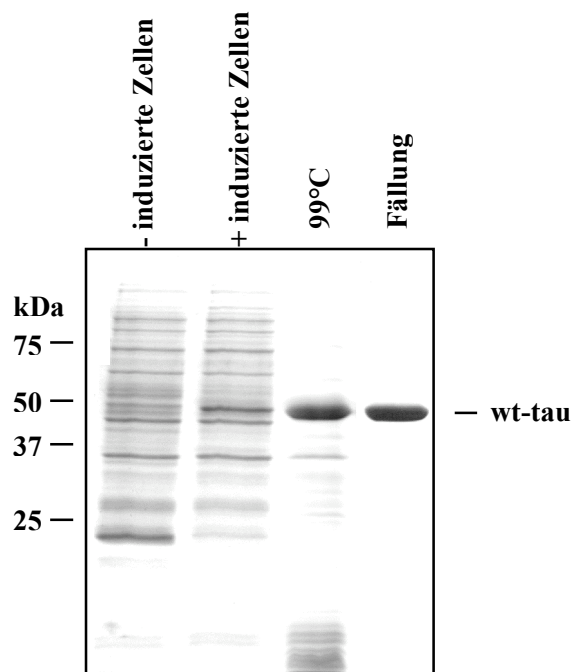


Abb. 3. 3 Überproduktion und Reinigung von wt-tau aus *E. coli*

Für die Reinigung von wt-tau wurde das pET-wt-tau Plasmid in BL21 (D3 plus) Rosetta Zellen transfiziert und die Zellen wurden bei 37°C kultiviert. Die Expression von tau erfolgte nach der Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM für 3 h bei 37°C. Die Reinigung von tau wurde durch Erhitzen bei 99°C und 40% Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Auftrennung von jeweils 5 µg Protein erfolgte durch ein 10%-iges SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Anfärbung durch Coomassie-Blau.

In Abb. 3. 3 ist exemplarisch die Reinigung von wt-tau gezeigt. Das Protein wurde bei seinem theoretischen Molekulargewicht von 45 kDa auf dem SDS-Gel detektiert. Die Reinheit von PHP-tau und Ala-tau entsprach der des wt-tau-Proteins (Daten nicht gezeigt). Die Reinigungen wurden mittels Western-Blots mit Antikörpern gegen tau verifiziert (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Das tau-Protein wird von HtrA1 proteolytisch abgebaut

3.1.3.1 Verdau von tau durch HtrA1

Um die Hypothese zu testen, dass tau ein Substrat von HtrA1 ist, wurden die tau-Varianten (wt-tau, PHP-tau oder Ala-tau) mit HtrA1 in Reaktionspuffer inkubiert. Dabei wurde ein Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 und 50:1 untersucht und die Proteolyse wurde zeitabhängig mittels Western-Blot analysiert. Die Western-Blot-Analyse hatte den Vorteil, dass auch Fragmente, die in geringen Mengen entstanden, nachweisbar waren.

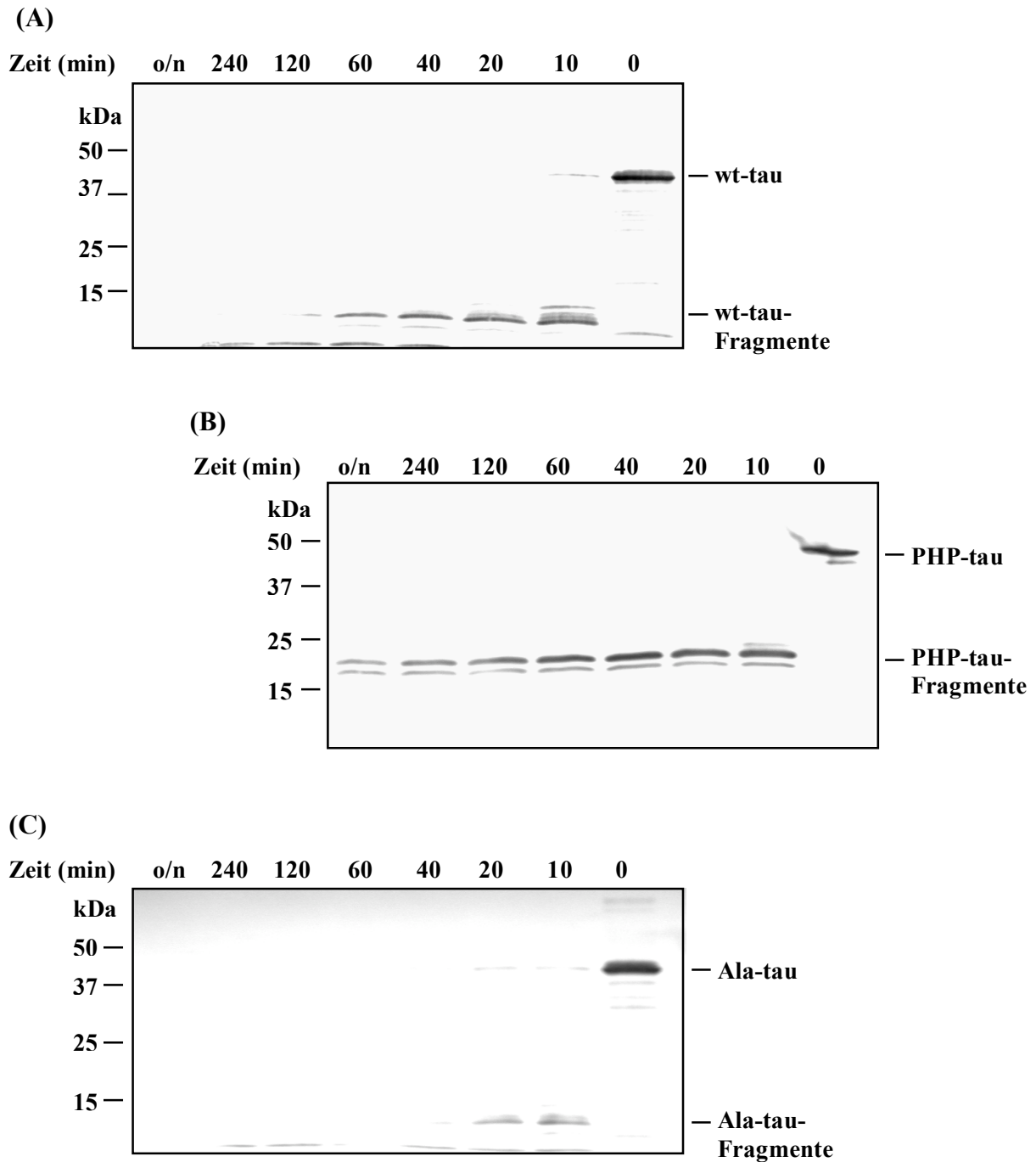
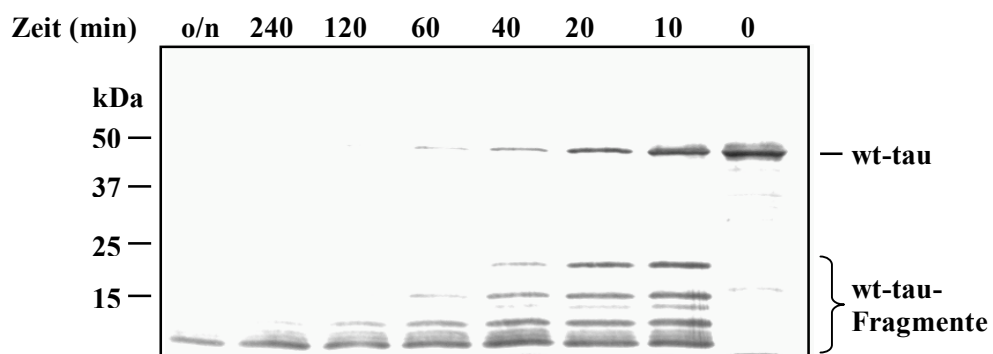


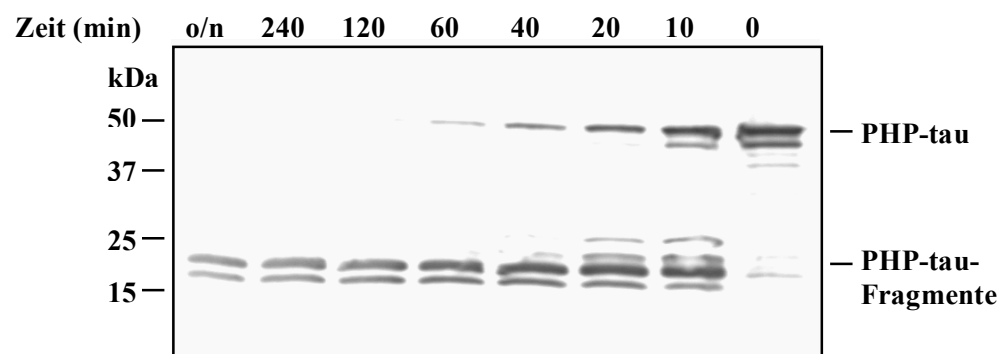
Abb. 3. 4 Abbau von wt-tau, PHP-tau oder Ala-tau durch HtrA1 mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1

Gereinigte tau-Proteine (1 µg) wurden mit gereinigtem HtrA1-Protein (0,1 µg) in 50 mM Tris, pH 8,0 bei 37°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach den angegebenen Zeitpunkten. Anschließend wurden die Proben auf ein 10%-iges SDS-PAGE aufgetragen und mittels Western-Blot analysiert. Zum Nachweis des tau-Proteins wurde ein polyklonaler α-tau Antikörper verwendet. Dargestellt ist der Verdau von wt-tau (A) von PHP-tau (B) und Ala-tau (C).

(A)



(B)



(C)

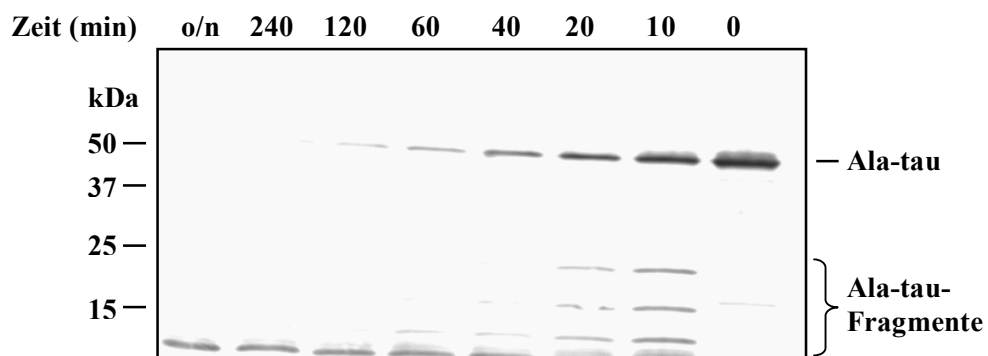


Abb. 3.5 Abbau von wt-tau, PHP-tau oder Ala-tau durch HtrA1 mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 50:1

Gleiche Bildbeschreibung wie für Abb. 3.4 mit Ausnahme der eingesetzten tau- (1 µg) und HtrA1-Proteinmenge (0,02 µg).

Das Ergebnis des Verdaus zeigte deutlich, dass tau ein Substrat von HtrA1 ist. Bei einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 wurden alle drei tau-Varianten nach 10 min fast vollständig abgebaut (Abb. 3. 4). Bei einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 50:1 wurden alle drei tau-Varianten nach 120 min fast vollständig abgebaut (Abb. 3. 5). Der Verdau von PHP-tau führte zu der Entstehung eines 20 kDa Fragments, welches selbst durch längere Inkubation nicht komplett abgebaut werden konnte. Beim Verdau von wt-tau und Ala-tau entstanden kleinere Fragmente, die nach kürzester Zeit abgebaut wurden, wobei die Proteolyse der Fragmente bei Ala-tau zeitlich schneller erfolgte. Zu keinem Zeitpunkt konnte beim wt-tau oder Ala-tau Verdau ein Fragment von 20 kDa detektiert werden.

Diese Daten zeigen, dass tau von HtrA1 proteolysiert wurde. Vermutlich führte jedoch der Austausch von Serin/Threonin-Resten zu Glutamat bzw. Alanin zu einem veränderten Schnittmuster. Um diese Annahme zu klären, wurde eine massenspektrometrische (Maldi-TOF)¹ Analyse der verdauten tau-Fragmente durchgeführt.

3.1.3.2 Bestimmung der HtrA1 Schnittstellen innerhalb des tau-Proteins

In Gehirngewebe von AD Patienten können neurofibrilläre Bündel nachgewiesen werden, bestehend aus aggregierten hyperphosphorylierten tau-Protein. Für die Ausbildung dieser Aggregate sind die *Repats* und die *Self-Assembly-Region* des tau-Proteins von entscheidender Bedeutung (von Bergen *et al.*, 2000).

Um zu untersuchen, ob aggregiertes tau ebenfalls ein potentielles Substrat für HtrA1 sein könnte, wurde eine Schnittstellenanalyse der tau-Fragmente mittels Maldi-TOF¹ Analyse durchgeführt. Die Analyse sollte klären, ob HtrA1 in der Lage ist innerhalb der *Repats* und der *Self-Assembly-Region* zu schneiden und somit die Zusammenlagerung von tau-Proteinen zu verhindern bzw. bereits vorhandene Filamente aufzulösen. Des weiteren sollte die Analyse klären, ob tatsächlich ein verändertes Schnittmuster bei den tau-Varianten entsteht und in welcher Region des PHP-tau-Proteins sich das 20 kDa Fragment befindet. Hiefür wurden die drei tau-Varianten und HtrA1 mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 für 4 h inkubiert und mittels Maldi-TOF analysiert.

¹ die Maldi-TOF-Analyse wurde im Institut für Molekulare Pathologie (IMP) in Wien durchgeführt

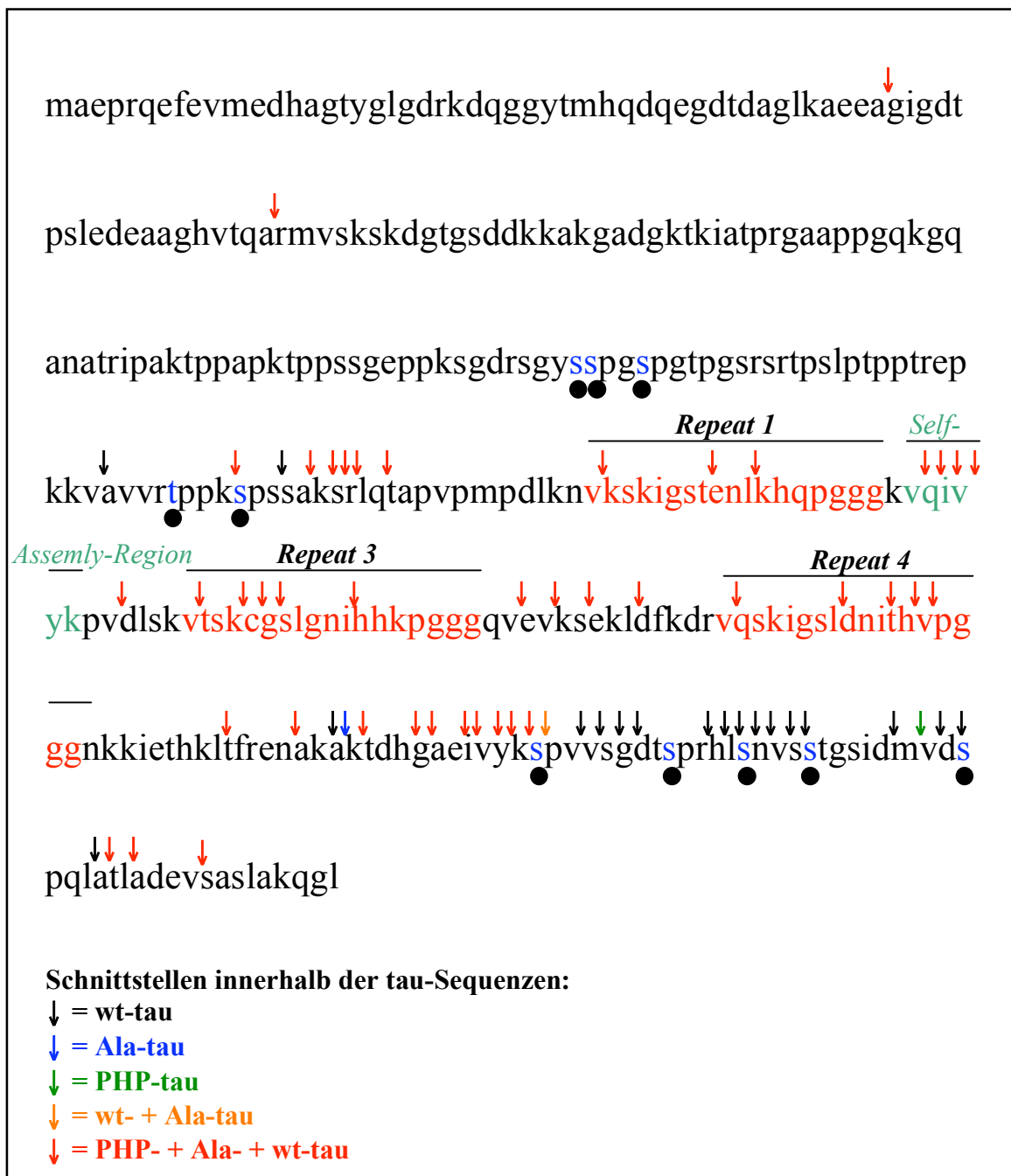


Abb. 3. 6 Übersicht der durch HtrA1 entstandenen Schnittstellen innerhalb der tau-Sequenzen

Gereinigtes tau-Protein (10 µg) wurde mit gereinigtem HtrA1 (1 µg) in 50 mM Tris, pH 8 bei 37°C für 4 h inkubiert. Die Fragmente von wt-tau, PHP-tau und Ala-tau wurden mit Hilfe der Maldi-TOF Analyse ermittelt. Die *Repeats* (rot) und die *Self-Assembly-Region* (grün) sind dargestellt. Die schwarzen Punkte unterhalb der Sequenz zeigen die Position des Austausches von Serin/Threonin-Resten gegen Glutamat bzw. Alanin an. Die Pfeile lokalisieren die Schnittstellen innerhalb der tau-Sequenz. Durch die farbliche Darstellung der Pfeile kann man die Schnitte innerhalb der drei tau-Sequenzen unterscheiden.

Die Auswertung der gefundenen Schnittstellen ergab, dass alle drei tau-Varianten von HtrA1 mit einer erhöhten Frequenz innerhalb der *Repeats* und der *Self-Assembly-Region* geschnitten wurden (Abb. 3. 6). Bemerkenswerterweise führte der Austausch von Serin/Threonin-Resten gegen Glutamat bzw. Alanin zu keinem veränderten Schnittmuster in dieser Region. Allerdings wurde der C-Terminus des wt-tau-Proteins wesentlich häufiger geschnitten, als der C-Terminus des PHP- und Ala-tau-Proteins.

Die Analyse des PHP-tau Verdaus zeigte, dass am N-Terminus ein Fragment mit einer molaren Masse von 20 kDa entstand. Dieses Fragment konnte jedoch von HtrA1 an zwei Positionen geschnitten werden, wodurch ein Abbau des Fragments ermöglicht wurde.

Die Auszählung der Fragmente ergab, dass etwa 45 Fragmente entstanden, die in ihre Länge zwischen 8 und 38 As-Resten variierten. Am häufigsten wurden Fragmentgrößen zwischen 9 und 22 As-Resten bestimmt. Aus diesen 45 Fragmenten wurde mit Hilfe des Programms „weblogo“ (www.weblogo.berkeley.edu) ein Profil angelegt.

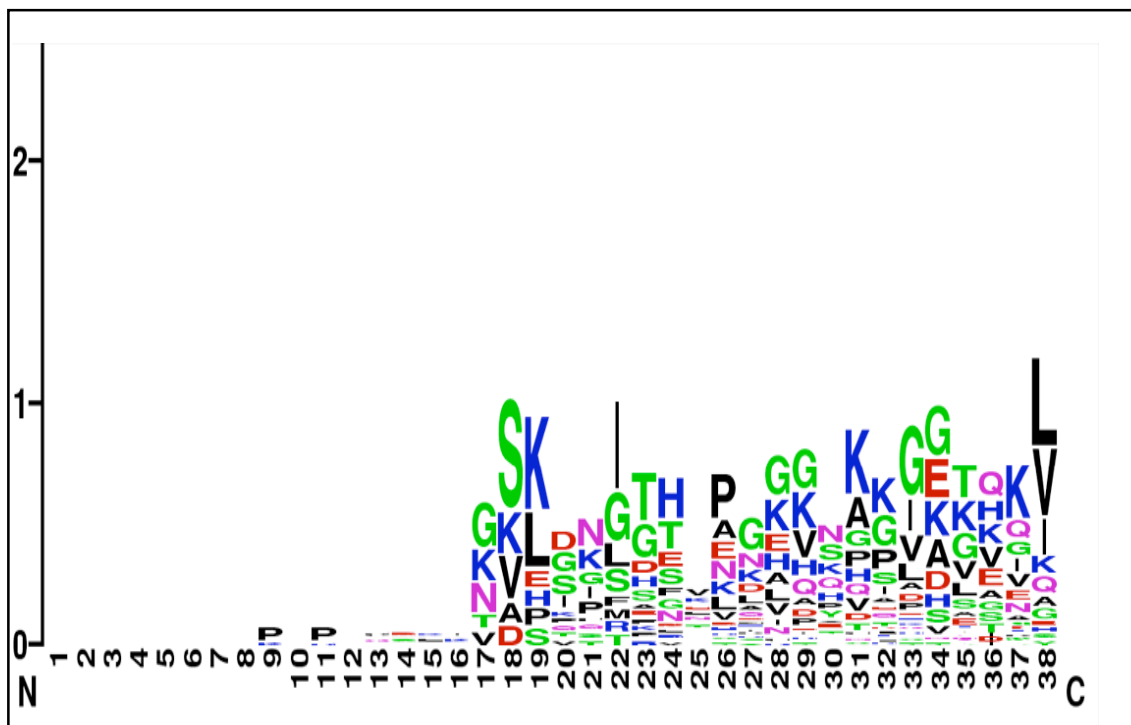


Abb. 3. 7 Profil des Komplettverdaus von PHP-tau durch HtrA1

Die Aminosäuresequenz der Fragmente wurde von der N-terminalen bis zur C-terminalen As aufgetragen. Die am häufigsten vorkommenden As sind an oberster Stelle dargestellt.

Das Profil zeigte eine erhöhte Häufigkeit der As Leucin, Valin und Isoleucin für die P1 Stelle (Abb. 3. 7). Hierbei handelt es sich um kleine hydrophobe As, für die HtrA1 eine Spezifität zu haben scheint. Für die weiteren Positionen zeigte HtrA1 eine geringe Spezifität. Diese Eigenschaften decken sich mit dem Schnittmuster der bakteriellen HtrA Protease DegP. DegP baut ungefaltete Proteine ab, wobei am häufigsten Fragmente mit einer Fragmentgröße zwischen 13-15 Resten entstehen. Wie HtrA1 besitzt DegP dabei eine Vorliebe für kleine hydrophobe As an der P1 Stelle (Kolmar *et al.*, 1996; Spiess *et al.*, 1999; Krojer *et al.*, 2008).

3.1.3.3 Durch Formaldehyd quervernetzte tau-Aggregate werden von HtrA1 abgebaut

Die pathologischen Aggregate von tau sind ein wichtiges Merkmal bei AD. Zur Klärung, ob aggregiertes tau-Protein ein Substrat von HtrA1 sein könnte, musste zunächst unter Anwendung des Cross-Linking Prinzips große tau-Aggregate erzeugt werden (2.3.11). Diese Methode erlaubt mittels des Cross-Linkers Formaldehyd, Aggregate zu generieren, die in ihrer Größe und Struktur große Ähnlichkeit mit den Ablagerungen des tau-Proteins in Gehirngewebe aufweisen (Nie *et al.*, 2007a; Nie *et al.*, 2007b). Hierfür wurde das tau-Protein (wt-tau, Ala-tau oder PHP-tau) in 50 mM NaH₂PO₄ für 10 min mit 1% Formaldehyd inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnten Zwischenstufen des aggregierten tau-Proteins in Form von Monomeren, Dimeren und Oligomeren bestimmt werden. Im Anschluss wurden die Aggregate mit Ammoniumsulfat gefällt, um das restliche Formaldehyd zu entfernen, da dieses die proteolytische Aktivität von HtrA1 stark herabgesetzt hätte (Daten nicht gezeigt). Die hergestellten tau-Aggregate und HtrA1 wurden mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 inkubiert. Anschließend wurde der Verdau auf ein NuPAGE Novex Midi Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und Coomassie gefärbt.

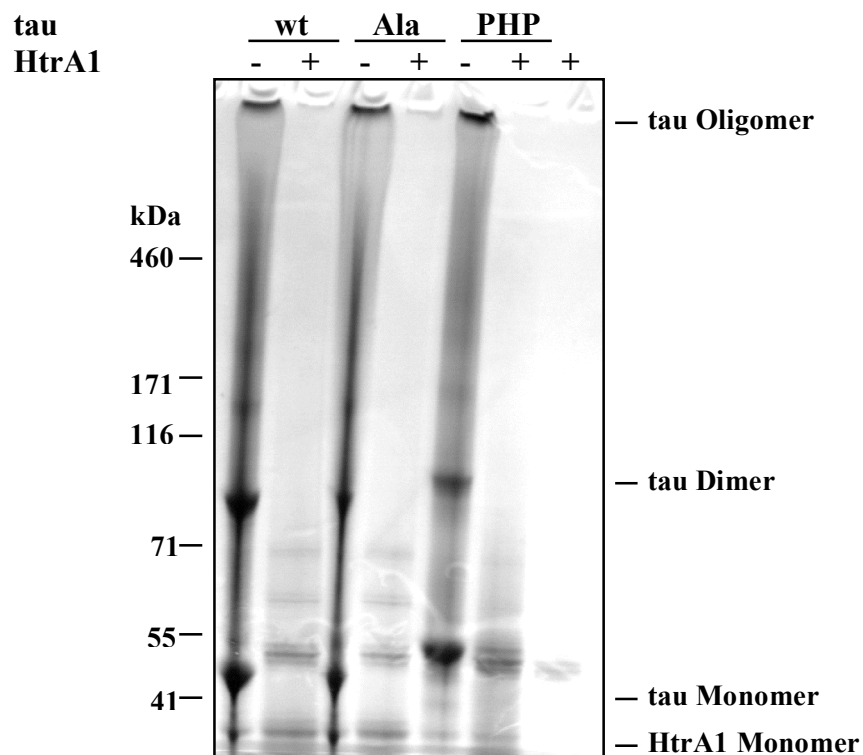


Abb. 3. 8 Aggregation des tau-Proteins mittels Cross-Link und anschließender Abbau durch HtrA1

Es wurden 30 µg tau-Protein (wt-tau, PHP-tau und Ala-tau) mit dem Cross-Linker Formaldehyd (1%) in 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,2 für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit 40% Ammoniumsulfat gefällt. Das gefällte Protein wurde in 50 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert und HtrA1 (3 µg) wurde zugegeben, so dass ein Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 eingestellt wurde. Als Kontrolle wurden die tau-Varianten ohne HtrA1 inkubiert. Die Proben wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben mittels NuPAGE Novex Midi Gel. Im Anschluss wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt.

Das Ergebnis des Verdaus zeigte deutlich, dass HtrA1 Monomere, Dimere und Oligomere des tau-Proteins vollständig proteolytisch abbauen konnte. Bemerkenswerterweise konnte die Protease tau-Aggregate abbauen, die größer als 1 MDa waren. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Pseudohyperphosphorylierung von tau keine Beeinträchtigung der proteolytischen Aktivität von HtrA1 zur Folge hatte (Abb. 3. 8).

3.1.3.4 Analyse von mit Formaldehyd behandelten tau-Fragmenten

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die HtrA1 Protease das tau-Protein und seine Aggregate effizient abbauen kann. Es stellt sich nun die Frage, ob die durch HtrA1 entstehenden tau-Fragmente ihre Fähigkeit zur Aggregation verloren haben. Um diese Frage zu klären, wurden tau-Fragmente mit dem Cross-Linker Formaldehyd behandelt und mittels elektrophoretischer Auftrennung wurde die Entstehung von Aggregaten analysiert.

Hierfür wurde tau und HtrA1 mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 inkubiert. Anschließend wurden die tau-Fragmente mit 1%, 0,1% und 0,01% Formaldehyd inkubiert. Als Kontrolle wurde natives tau-Protein mit den gleichen Mengen an Formaldehyd behandelt. Am nächsten Tag wurden die Proben auf ein NuPAGE Novex Midi Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und Coomassie gefärbt.

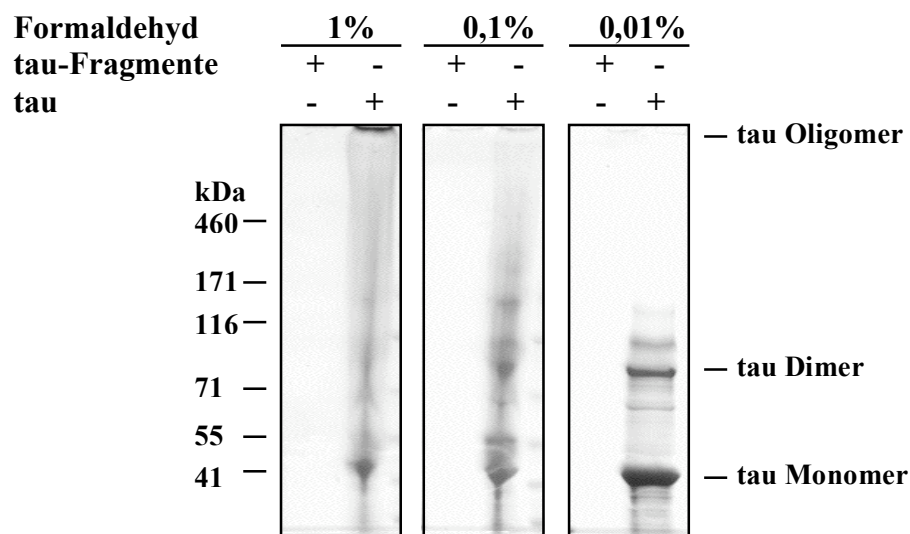


Abb. 3. 9 Behandlung von tau-Fragmenten und nativen tau-Protein mit 1%, 0,1% und 0,01% Formaldehyd

Es wurden 30 µg tau-Protein mit HtrA1 (3µg) in 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,2 für 4 h bei 37°C inkubiert. Die tau-Fragmente wurden mittels Vivaspin 15R, 10 kDa, von HtrA1 separiert. Anschließend wurden 10 µg tau-Fragment mit 1%, 0,01% oder 0,01% Formaldehyd über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurden je 10 µg tau-Protein mit den gleichen Konzentrationen an Formaldehyd über Nacht inkubiert. Eine elektrophoretische Auftrennung der Proben mittels NuPAGE Novex Midi Gel erfolgte und im Anschluss wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt.

Die Behandlung der tau-Fragmente mit Formaldehyd führte zu keiner Aggregation, wohingegen die gleiche Behandlung des nativen tau-Proteins zu oligomeren Zuständen führte (Abb. 3. 9).

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der Schnittstellenanalyse überein (3.1.3.2) und zeigt eindeutig, dass HtrA1 das tau-Protein so proteolysiert, dass die Regionen, die für die Aggregation entscheidend sind, abgebaut werden.

3.1.3.5 Abbau von gepaarten helikalen Filamenten durch HtrA1

Die Hyperphosphorylierung und die Aggregation von tau-Proteinen begünstigt die Entstehung von gepaarten helikalen Filamenten (PHFs), die in Gehirngewebe von AD Patienten nachgewiesen werden können (Berriman *et al.*, 2003). Eine Protease, die die Entstehung der PHFs verhindern bzw. bereits vorhandene Filamente auflösen kann, könnte von großem Interesse für die Entwicklung eines Therapieansatzes sein.

Um die Bedeutung von HtrA1 beim Abbau von PHFs zu analysieren, wurden diese aus Gehirngeweben von AD Patienten gereinigt (Brandt *et al.*, 2009). Die PHFs¹ wurden sonifiziert und mit einem Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 mit HtrA1 inkubiert (2.3.12). Anschließend wurde der Verdau mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Ein monoklonaler α -tau-Antikörper, der die Phosphorylierungsstelle an As 396 erkennt, wurde zum Nachweis der PHFs verwendet. In früheren Arbeiten wurde dieser Antikörper bereits als gute Nachweismethode für PHFs beschrieben (Brandt *et al.*, 2009).

Mittels Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die tau-Proteine in einem oligomeren Zustand vorlagen. Es wurden Aggregate detektiert, die größer als 1 MDa waren. Bemerkenswerterweise führte die Inkubation von PHFs mit HtrA1 nach 5 h zu einem deutlichen Abbau der hyperphosphorylierten tau-Aggregate. Die Inkubation der PHFs mit der Protease über Nacht führte zu einem fast vollständigen Abbau. Sogar 1 MDa große tau-Aggregate wurden von HtrA1 fast vollständig degradiert (Abb. 3. 10).

Anhand dieser Ergebnisse kann die Hypothese bestätigt werden, dass hocholigomere hyperphosphorylierte tau-Aggregate von HtrA1 effizient abgebaut werden können.

¹ freundlicherweise von Prof. Brandt, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt

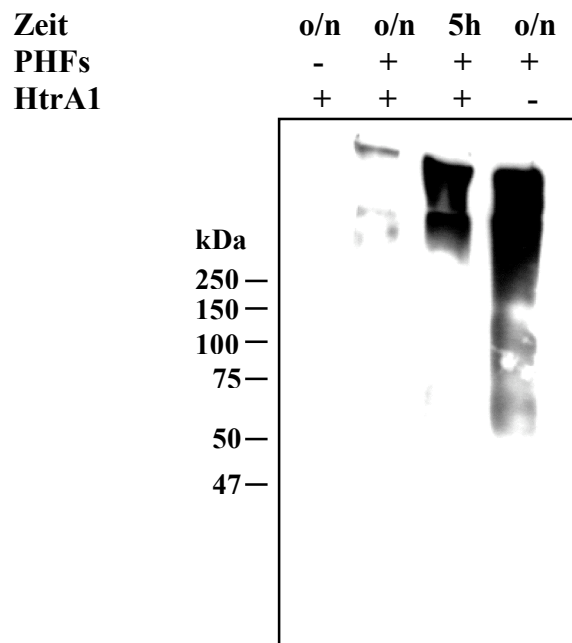


Abb. 3. 10 Analyse des PHFs Abbaus durch HtrA1

Zunächst wurden die PHFs (1 µg) für 15 min sonifiziert. Anschließend wurden sie mit HtrA1 (0,1 µg) inkubiert, so dass ein Substrat:Enzym Mengenverhältnis von 10:1 entstand. Die Proben wurden in 50 mM Tris, pH 8,0 bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde nach 5 h und über Nacht (o/n) gestoppt. Als Kontrolle wurden PHFs und HtrA1 separat über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und ein Western-Blot durchgeführt. Zum Nachweis von tau wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle-396 des tau-Proteins verwendet.

3.1.4 Etablierung eines quantifizierbaren Enzymtests

Durch die Etablierung eines Enzymtests können Rückschlüsse über Substratspezifität und kinetischen Eigenschaften von HtrA1 getroffen werden. Der Enzymtest hat den Vorteil, dass er schnell durchzuführen und quantifizierbar ist. Des weiteren kann mit Hilfe eines Enzymtests ein *High Throughput Screen* (HTS) durchgeführt werden. Hierbei könnte HtrA1 mit mehreren tausend Substanzen inkubiert werden um eine mögliche Inhibierung oder Aktivierung der Enzymaktivität festzustellen. Die dabei gefundenen Inhibitoren und Aktivatoren könnten auf ihre biochemischen und strukturellen Eigenschaften weiter analysiert werden. Ein geeigneter Inhibitor könnte die Röntgenkristallstrukturanalyse von HtrA1 vorantreiben. Ein spezifischer Aktivator könnte als mögliche Therapiestrategie von AD verwendet werden.

3.1.4.1 Identifikation von synthetischen HtrA1-Substraten

Um einen Enzymtest für HtrA1 zu etablieren, wurden synthetisch Oligopeptide mit einer p-Nitroanilin-Gruppe (pNA) am C-Terminus gekoppelt. Die Abspaltung des pNAs mittels Proteolyse führte zu einem Absorptionsanstieg bei 405 nm, welcher quantifiziert werden konnte.

Anhand der Kompletต์verdauanalyse (3.1.3.2) wurden fünf tau-Sequenzen ausgewählt, welche synthetisch hergestellt und am C-Terminus mit einem pNA gekoppelt¹ wurden, im Folgenden bezeichnet als tau-pNAs. Zusätzlich wurden die im Labor vorhandenen pNA-Peptide¹ getestet, welche von anderen Proteinsequenzen abgeleitet wurden (Tab. 2. 8). Die pNA Peptide wurden im Enzymtest mit HtrA1 eingesetzt und die spezifische Aktivität für die jeweiligen Substrate bestimmt (2.3.9).

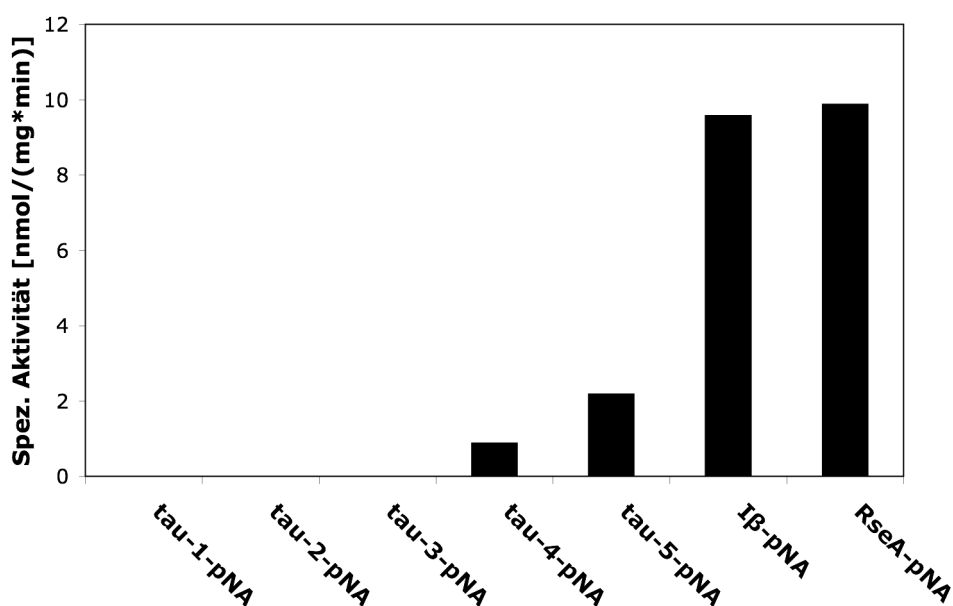


Abb. 3. 11 Bestimmung der spezifischen Aktivität für unterschiedliche pNA-Substrate

Die Peptide wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mM im Enzymtest eingesetzt und mit 1,35 µM HtrA1 gemischt. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0) auf 100 µl aufgefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm kontinuierlich bei 37°C für 1 h gemessen. Den spezifischen Aktivitäten liegen Dreifachbestimmungen mit einer Standardabweichung von < 10% zugrunde.

¹ die pNA-Substratsynthese erfolgte in Kooperation mit dem Chemical-Genomis-Center (CGC) in Dortmund

Von den fünf synthetisierten tau-pNAs konnten das tau-4- und tau-5-pNA mittels Enzymtest als Substrate von HtrA1 identifiziert werden. Die hierbei bestimmte spezifische Aktivität für das tau-4-pNA lag bei $0,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und für das tau-5-pNAs lag bei $2,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 3. 11).

Interessanterweise befinden sich die Sequenzen des tau-4- und tau-5-pNAs innerhalb der Tubulin-Bindenden-Region (Abb. 3. 12).

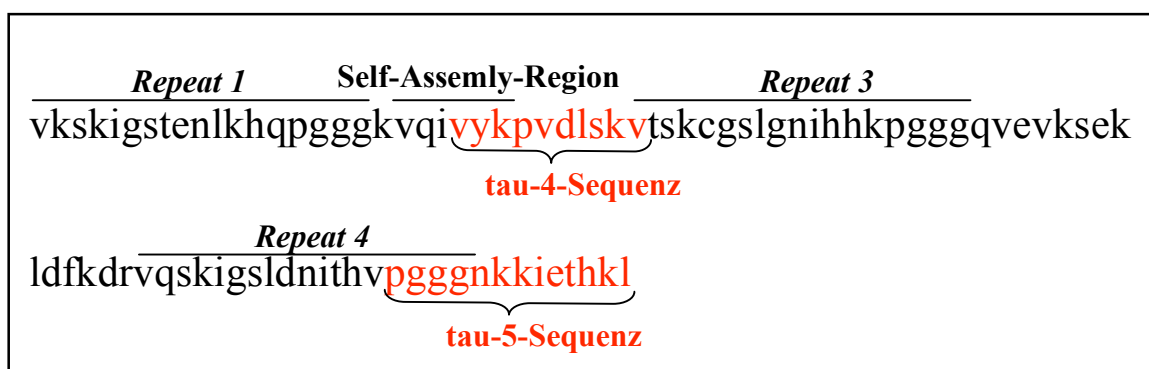


Abb. 3. 12 Lokalisation der tau-4- und tau-5-Sequenz innerhalb der Tubulin-Bindenden-Region des tau-Proteins

Darstellung der Aminosäuresequenz der Tubulin-Bindenden-Region des tau-Proteins, mit den Repeats und die Self-Assembly-Region. Die Sequenzen des tau-4- und des tau-5-pNA sind in rot dargestellt.

Des weiteren wurden die im Labor vorhandenen pNA-Peptide im Enzymtest untersucht, um die spezifische Aktivität für die jeweiligen Substrate zu bestimmen. Hierbei konnten zwei synthetische Peptide als Substrate von HtrA1 identifiziert werden. Zum einen das FANQHLCGSHLVEA-pNA, abgeleitet von der Insulin β -Kette und im Folgenden als I β -pNA bezeichnet, wurde von HtrA1 mit einer spezifischen Aktivität von $9,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ umgesetzt. Zum anderen das FNTLPMMGKASPV-pNA, abgeleitet vom bakteriellen RseA und im Folgenden als RseA-pNA bezeichnet, wurde von HtrA1 mit einer spezifischen Aktivität von $9,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ umgesetzt (Abb. 3. 11). Das ResA-pNA wurde ursprünglich als Substrat von DegS, einem Familienmitglied von HtrA1, identifiziert (1.4.1).

Um die kinetischen Eigenschaften von HtrA1 zu analysieren, wurde die Protease bei unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate tau-4-pNA, tau-5-pNA und Iβ-pNA untersucht. Aufgrund der geringen Vorräte des RseA-pNAs konnte dieses Substrat nicht analysiert werden. Die kinetischen Eigenschaften wurden in Form der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) und der Substrataffinität (K_m) ermittelt. V_{\max} gibt an, bei welcher Substratkonzentration alle Enzyme als reaktionsfähige Enzym-Substrat-Komplexe vorliegen. Der K_m -Wert entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwerts erreicht hat. Hierdurch können Rückschlüsse im Hinblick auf die Affinität des Enzyms zum Substrat gezogen werden. Es wurden Substratkonzentrationen von 0,1 bis 5 mM im Enzymtest eingestellt (2.3.9). Zur Berechnung der Daten wurde die Software “GraphPad Prism5“ verwendet, um den V_{\max} - und den K_m -Wert nach Michaelis-Menten-Analyse zu ermittelt.

Tab. 3. 1 Michaelis-Menten-Analyse der pNA-Substrate

Die Peptide wurden in Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 mM im Enzymtest eingesetzt. Die HtrA1 Konzentration betrug 1,35 μM . Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0) auf 100 μl aufgefüllt und die Absorption kontinuierlich bei 37°C für 1 h gemessen. Den spezifischen Aktivitäten liegen Dreifachbestimmungen mit einer Standardabweichung von < 10% zugrunde. Die Daten wurden nach Michaelis-Menten-Analyse ausgewertet.

| | tau-4-pNA | tau-5-pNA | Iβ-pNA |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| V_{\max} | 300 nmol * min ⁻¹ | 63,8 nmol * min ⁻¹ | 72 nmol * min ⁻¹ |
| K_m-Wert | 23,1 mM | 1,9 mM | 0,3 mM |

Das Ergebnis der Michaelis-Menten-Analyse ergab, dass HtrA1 eine höhere Affinität für das tau-5-pNA und das Iβ-pNA aufwies, als für das tau-4-pNA. Dies deutet auf eine bessere Substratspezifität der Protease für das tau-5-pNA und das Iβ-pNA Substrat hin (Tab. 3. 1).

3.1.4.2 Inhibierung der proteolytischen Aktivität von HtrA1

Um einen Inhibitor für HtrA1 zu identifizieren, wurden Boronsäure-Derivate im Enzymtest auf ihre inhibierende Wirkung hin getestet. Hierzu wurden verschiedene Peptide mit Boronsäuren am C-Terminus verknüpft. Solche Boronsäurederivate werden oft als

Serinproteaseinhibitoren eingesetzt. Die Boronsäuren formen stabile Addukte mit Ser₃₀₆, die dem tetraedischen Übergangszustand in der Protease-Reaktion ähneln. Dabei bindet die Boronsäure nahezu irreversibel an HtrA1 (Philip und Bender, 1983).

Der Enzymtest wurde mit dem I β -pNA durchgeführt. Vor der Zugabe des Substrates fand eine 5 minütige Vorinkubation von HtrA1 mit dem potentiellen Inhibitor statt (2.3.9). Als Referenz diente ein Ansatz ohne Inhibitor.

Es konnte ein Boronsäure-Derivat identifiziert werden, welches die proteolytische Aktivität von HtrA1 vollständig inhibierte. Dieses Derivat besaß die Sequenz DPMFKLV. Die Sequenz wurde beim Komplettverdau der Citrat-Synthase durch DegP, einem bakteriellen HtrA, identifiziert (Kolmar *et al.*, 1996; Krojer *et al.*, 2008). Anschließend wurde der Inhibitor (DPMFKLV-Boronsäure) in einer Testreihe mit sinkenden Inhibitorkonzentrationen im Enzymtest eingesetzt. Die Auswertung zeigte, bei welcher Inhibitorkonzentration eine 50%ige Inhibition (IC₅₀) von HtrA1 stattfand (Abb. 3. 13). Der IC₅₀ Wert des inhibitorischen-Peptides wurde mit 6,25 μ M bestimmt.

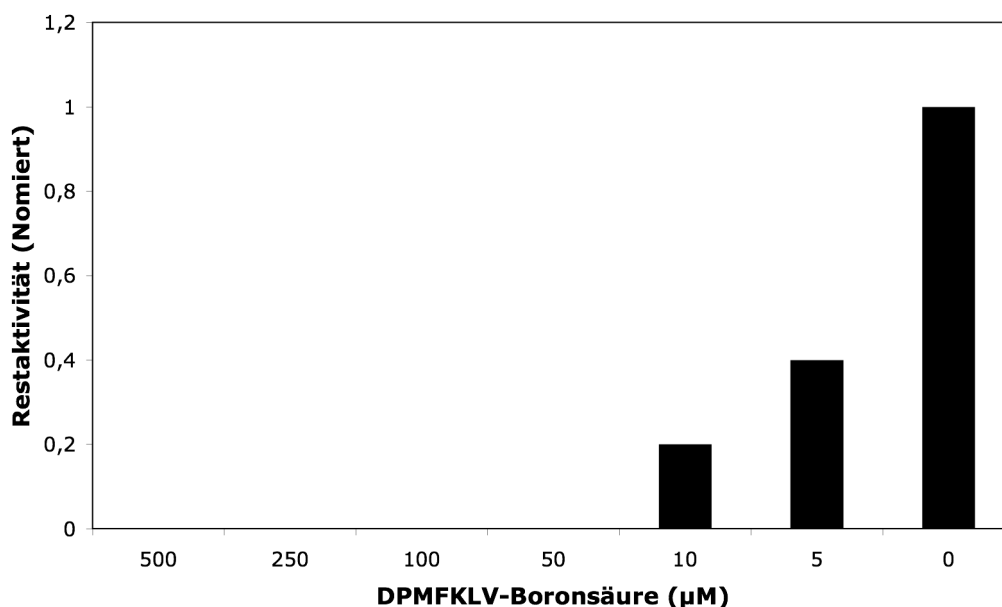


Abb. 3. 13 Konzentrationsreihe des DPMFKLV-Boronsäure Inhibitors im Enzymtest

Der DPMFKLV-Boronsäure Inhibitor wurde mit sinkenden Konzentrationen (0-500 μ M) im Enzymtest eingesetzt. Der Test wurde mit 1,35 μ M HtrA1 und 0,5 mM I β -pNA durchgeführt. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0) aufgefüllt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm kontinuierlich für 1 h bei 37°C gemessen. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert und gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration dargestellt. Die Standardabweichung lag unter 10%.

3.1.5 Zellbiologische Analysen von HtrA1 und tau

3.1.5.1 Der Effekt der HtrA1 Suppression auf wt-tau und PHP-tau überexprimierende PC12 Zelllinien

Um zu untersuchen, ob HtrA1 in Zellen einen protektiven Effekt gegen erhöhte tau-Proteinmengen besitzt, wurde HtrA1 in Zellen, welche bereits das tau-Protein stabil überexprimierten, mit Hilfe der RNAi-Technologie spezifisch herunterreguliert. Anschließend sollte der Effekt dieser Depletion auf die Zellen analysiert werden.

Zunächst wurde das shHtrA1rat-Konstrukt in den pLKO-Vektor¹ kloniert. Anschließend wurden PC12 Zellen aus der Ratte, die bereits stabil mit wt-tau², PHP-tau² oder dem Leervektor² transfiziert waren (Fath *et al.*, 2002), mit dem shHtrA1rat-Konstrukt mittels lentiviralem Gentransfer transduziert (2.4.10). Als Kontrolle wurden die Zelllinien mit dem lentiviralen Leervektor pLKO1.puro LV¹ transduziert.

Die PC12 Zelllinien konnten sowohl mit dem shHtrA1rat-pLKO-Vektor als auch mit dem pLKO1.puro LV erfolgreich transduziert werden. Die Effizienz der Transduktion wurde bestimmt und lag bei etwa 90%. Eine Kultivierung der transduzierten pLKOshHtrA1rat Zellen war jedoch nicht möglich, wohingegen die Zellen die mit dem pLKO1.puro LV transduziert wurden passagiert werden konnten. Der Versuch wurde zweimal wiederholt, ohne lebensfähige Zellen zu erhalten. Demzufolge konnten keine weiteren Tests durchgeführt werden. Die spezifische Depletion von HtrA1 mit Hilfe der RNAi-Technologie hatte demnach in den PC12 Zelllinien einen toxischen Effekt, da die Zellen nicht teilungsfähig waren, wohingegen die mit dem Leervektor transfizierten Zellen passagiert werden konnten.

¹ freundlicherweise von Prof. Hahn, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt

² freundlicherweise von Prof. Brandt, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt

3.1.5.2 Der Effekt der Überexpression von HtrA1 auf die wt-tau und PHP-tau-Proteinmenge in PC12 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde HtrA1 als tau Protease charakterisiert. Im nächsten Schritt sollte die Wirksamkeit der HtrA1 Protease beim Abbau von nativem und pseudohyperphosphorylierten tau-Protein in der Zelle analysiert werden. Hierfür wurde HtrA1 in den retroviralen pBABE-Vektor¹ kloniert und mittels retroviralen Gentransfers (2.4.11) in die PC12 Zelllinien, welche bereits stabil mit wt-tau, PHP-tau oder dem Leervektor transfiziert waren, eingebracht. Da es sich bei dem überexprimiertem tau-Protein um die humane Form handelte, wurde auch HtrA1 in der humanen Form für die Überexpression verwendet. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem pBABE-LV¹ transduziert.

Der retrovirale Gentransfer war erfolgreich und die Effizienz der Transduktion lag bei 60-70%. Die anschließende Selektionierung und Kultivierung der transduzierten PC12 Zelllinien waren ebenfalls erfolgreich und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnte die HtrA1 Überproduktion in den transduzierten wt-tau und PHP-tau PC12 Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3. 14).

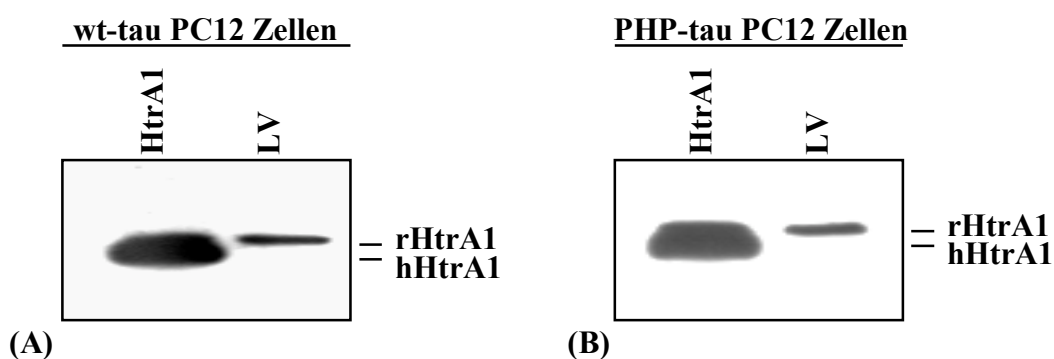


Abb. 3. 14 Western-Blot-Analyse der stabil mit HtrA1 transduzierten wt-tau und PHP-tau PC12 Zelllinien

PC12 Zellen, die wt-tau (A) oder PHP-tau (B) überexprimierten, wurden stabil mit HtrA1-transduziert. Es wurden je 30 µg Proteinlysate auf eine 10% SDS-PAGE aufgetragen und ein Western-Blot mittels polyklonalen α -PDZ-HtrA1 Antikörper durchgeführt. Die Immunodetektion von HtrA1 lies zwei Banden erkennbar, die obere Bande stellte das ratten HtrA1 (rHtrA1) und die untere Bande das humane HtrA1 (hHtrA1) dar.

¹ freundlicherweise von Prof. Hahn, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von HtrA1 zu einer Reduktion der tau-Proteinmenge führt, wurden die jeweiligen Proteinmengen, in den HtrA1 transduzierten PC12 Zelllinien und in den pBABA-LV transduzierten PC12 Zellen, mittels Western-Blot-Analyse immunodetektiert. Außerdem sollte die Western-Blot-Analyse klären, ob eine Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins einen Einfluss auf die proteolytische Aktivität der HtrA1 Protease hatte.

Die Analyse des Western-Blots zeigte eindeutig, dass die Überexpression von HtrA1 zu einer stark reduzierten wt-tau- und PHP-tau-Proteinmenge in den PC12 Zelllinien führte. Demzufolge hat die Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität der Protease (Abb. 3. 15). Als Kontrolle wurde in den Zelllinien Aktin nachgewiesen, um sicherzustellen, dass gleiche Mengen an Proteinlysate aufgetragen wurden.

Die Hypothese, dass HtrA1 eine tau Protease ist, konnte somit in Zellen nachgewiesen werden.

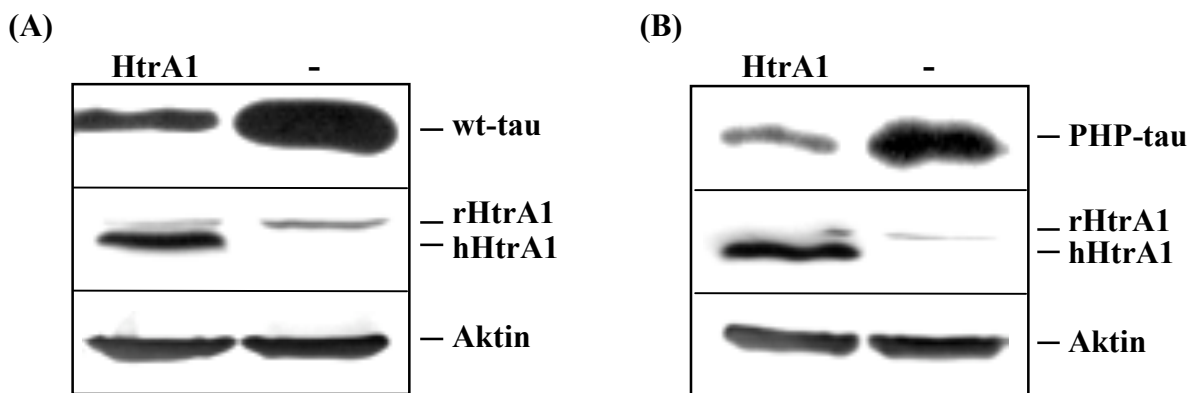


Abb. 3. 15 Effekt einer HtrA1 Überproduktion in wt-tau und PHP-tau PC12 Zelllinien

PC12 Zellen, die wt-tau (A) oder PHP-tau (B) überexprimierten, wurden stabil mit HtrA1 oder dem pBABA-LV transduziert. Es wurden je 30 µg Zelllysate auf eine 10% SDS-PAGE aufgetragen und Western-Blots wurden durchgeführt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper (monoklonaler α -tau-Antikörper, polyklonaler α -PDZ-HtrA1 Antikörper und monoklonaler α -Aktin-Antikörper). Bei dem HtrA1 Blot waren zwei Banden erkennbar, die obere Bande stellte das Ratten HtrA1 (rHtrA1) und die unteren Bande das humane HtrA1 (hHtrA1) dar.

3.1.5.3 Die Regulation der Expression von HtrA1 in tau überexprimierenden PC12 Zellen

Einige bakterielle HtrA Familienmitglieder spielen eine bedeutende Rolle in der Protein-Qualitätskontrolle und sind für den Abbau von falschgefalteten und ungefalteten Proteinen verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteasen durch Hitzeschock oder anderen Stressbedingungen überexprimiert werden (Clausen *et al.*, 2002).

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte intrazelluläre tau-Proteinmenge zu einer veränderten Expression des *HTRA1*-Gens führt, wurde die HtrA1-RNA-Expression in wt-tau und PHP-tau überexprimierenden PC12 Zellen untersucht und mit den Leervektor transfizierten PC12 Zellen verglichen. Hierfür wurde von allen drei Zelllinien die gleiche Menge RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert (2.2.14). Anschließend wurden die Daten mit Hilfe des ANOVA Programms ausgewertet.

Die Expressionsanalyse ergab, dass in den wt-tau und in den PHP-tau überexprimierenden PC12 Zellen die HtrA1-RNA-Expression erhöht war im Vergleich zu der Leervektor PC12 Zellen. Da ein p-Wert $< 0,05$ nachgewiesen werden konnte, kann dieses Ergebnis als signifikant angesehen werden. Die wt-tau PC12 Zellen zeigten eine 2,5-fache und die PHP-tau PC12 Zellen eine 6,8-fache Erhöhung der HtrA1-RNA-Expression (Abb. 3. 16). Demzufolge führte nicht nur die Überexpression, sondern auch die Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins zu einem deutlichen Anstieg der HtrA1-RNA-Expression.

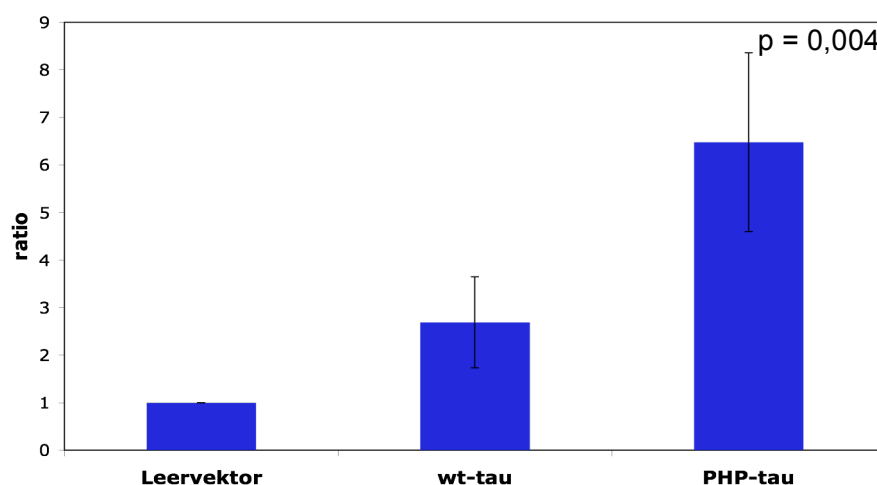


Abb. 3. 16 HtrA1-RNA-Expression in tau überexprimierenden PC12 Zelllinien

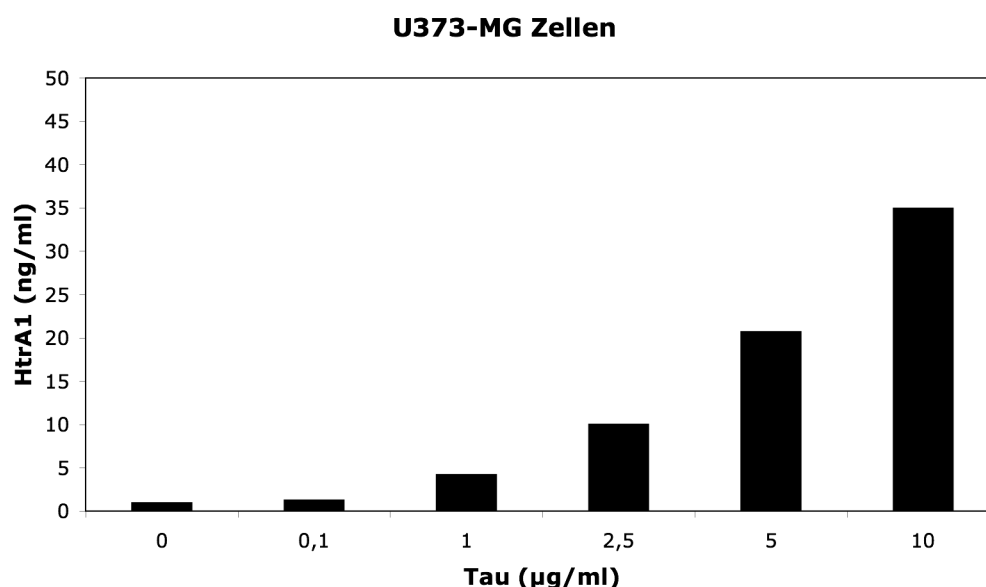
Graphische Darstellung der mittels qRT-PCR quantifizierten HtrA1-RNA-Expression in den Leervektor, wt-tau und PHP-tau überexprimierenden PC12 Zelllinien. Die relative Expression des *HTRA1*-Gens ist durch die Ratio gegeben.

3.1.5.4 HtrA1-Proteinmenge im Zellkulturüberstand von Zellen nach tau-Behandlung

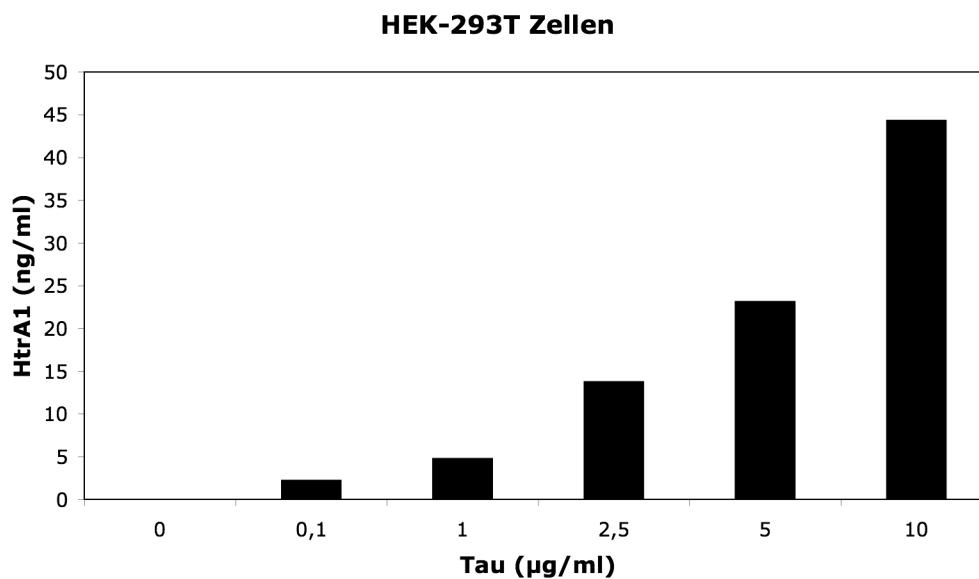
Die Ablagerungen des tau-Proteins findet man im Gehirn von AD Patienten nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär (Schwab *et al.*, 1995). Um zu untersuchen, ob eine erhöhte tau-Proteinmenge außerhalb der Zelle zu einem Anstieg der HtrA1-Proteinmenge führt, wurde gereinigtes wt-tau-Protein zum Überstand von Zellen gegeben. Der Effekt der tau-Behandlung sollte in den Zelllinien U373-MG, HEK-293T und PC12 untersucht werden (2.4.9), um zu klären, ob in allen drei Zelllinien ein vergleichbarer Anstieg der HtrA1-Proteinmenge untersucht werden kann. Zu diesem Zweck wurden in den Zellkulturüberstand der Zelllinien steigende wt-tau-Proteinmengen (0,1-10 µg/µl) gegeben. Dabei wurden Zellen als Kontrolle verwendet, denen statt der tau-Proteine das entsprechende Volumen an Puffer zugesetzt wurde. Die Zellen wurden für 2 h inkubiert und im Anschluss wurde mit Hilfe eines spezifischen HtrA1-ELISA die HtrA1-Proteinmenge bestimmt (2.3.14).

Die tau-Behandlung führte in allen drei Zelllinien zu einem deutlichen Anstieg der HtrA1-Proteinmenge. Dieser Effekt konnte proportional zu der steigenden tau-Proteinmenge beobachtet werden. Der Anstieg der HtrA1-Proteinmenge war in den U373-MG Zellen, im Vergleich zu den HEK-293T und PC12 Zellen, etwas geringer (Abb. 3. 17).

(A)



(B)



(C)

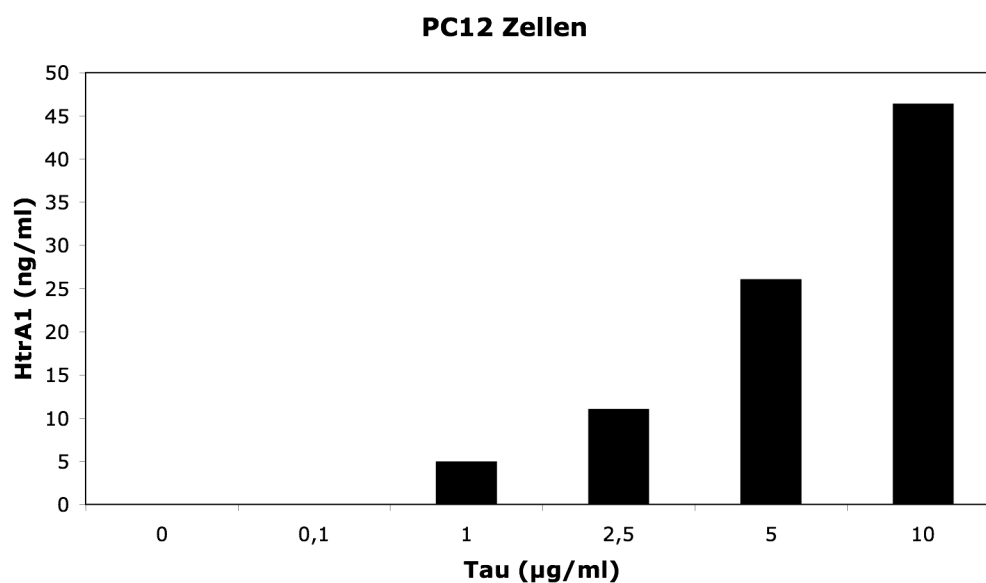


Abb. 3. 17 Die Zugabe von wt-tau zum Zellkulturüberstand verschiedener Zelllinien führt zu einem deutlichen Anstieg der HtrA1-Proteinmenge

Die Zelllinien U373-MG (A), HEK-293-T (B) und PC12 (C) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an gereinigtem wt-tau Protein (0,1-10 µg/ml tau-Protein) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 2 h im Begasungsbrutschrank inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die HtrA1-Proteinmenge wurde quantitativ mittels HtrA1-ELISA bestimmt. Die Standardabweichung lag unter 15%.

Anschließend sollte der Anstieg der HtrA1-Proteinmenge in den tau-behandelten Zellen, zeitabhängig analysiert werden. Hierfür wurden in den Zellkulturüberstand der U373-MG, HEK-293T und PC12 Zelllinien 2,5 µg/ml wt-tau-Protein gegeben und der Anstieg der HtrA1-Proteinmenge wurde über einen Zeitraum von 6 h mittels HtrA1-ELISA quantifiziert.

Das Ergebnis der zeitabhängigen Studie ergab, dass im Zellkulturüberstand der tau-behandelten Zelllinien ein maximaler Anstieg der HtrA1-Proteinmenge nach 2 h nachgewiesen werden konnte. Im Anschluss konnte ein Absinken der HtrA1-Proteinmenge beobachtet werden. Bei den HEK-293T Zellen war der deutlichste Anstieg der HtrA1-Proteinmenge detektierbar (Abb. 3. 18).

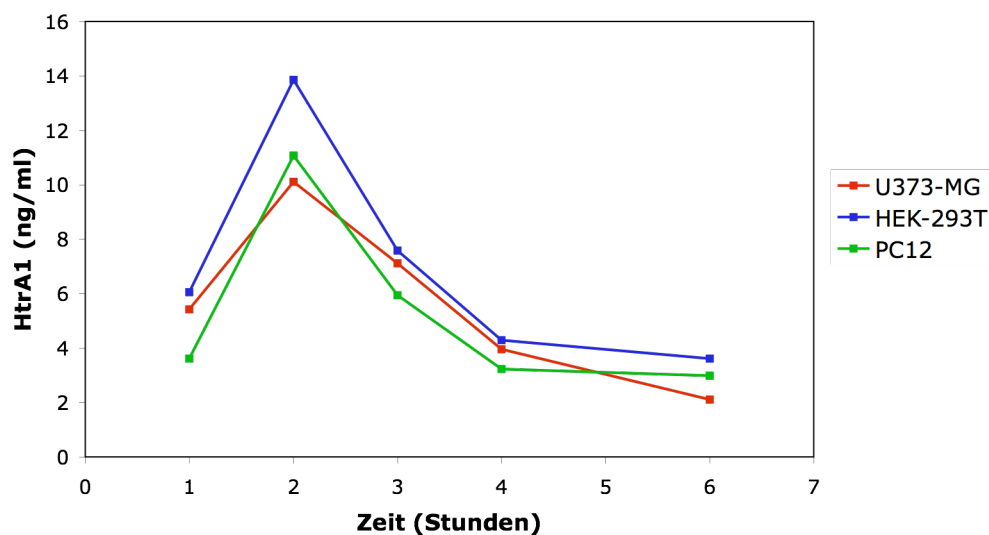


Abb. 3. 18 Zeitabhängiger Anstieg der HtrA1-Proteinmenge in tau-behandelten Zelllinien

Die Zelllinien U373-MG (rot), HEK-293T (blau) und PC12 Zellen (grün) wurden mit 2,5 µg/ml wt-tau-Protein behandelt. Danach wurden die Zellen im Begasungsbrutschrank inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (1 h – 6 h) wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die HtrA1-Proteinmenge wurde quantitativ mittels HtrA1-ELISA bestimmt. Die Standardabweichung lag unter 15%.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen mit dem wt-tau-Protein ein Anstieg der HtrA1-Proteinmenge zur Folge hatte. Es stellt sich nun die Frage, ob die Behandlung der Zellen mit dem PHP-tau-Protein zu einem ähnlichen Anstieg führt? Um diese Frage zu beantworten, wurden die U373-MG Zellen exemplarisch unter den gleichen Bedingungen mit dem PHP-tau-Protein inkubiert und die HtrA1-Proteinmenge wurde quantifiziert.

Das Ergebnis zeigte, dass die HtrA1-Proteinmenge in den U373-MG Zellen proportional zu der PHP-tau-Proteinmenge anstieg (Abb. 3. 19). Der Vergleich mit den wt-tau behandelten Zellen (Abb. 3. 17 A) zeigte, dass ein vergleichbarer Anstieg der HtrA1-Proteinmenge bestimmt werden konnte. Eine Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins hatte demzufolge keinen additiven Effekt auf den Anstieg der HtrA1-Proteinmenge.

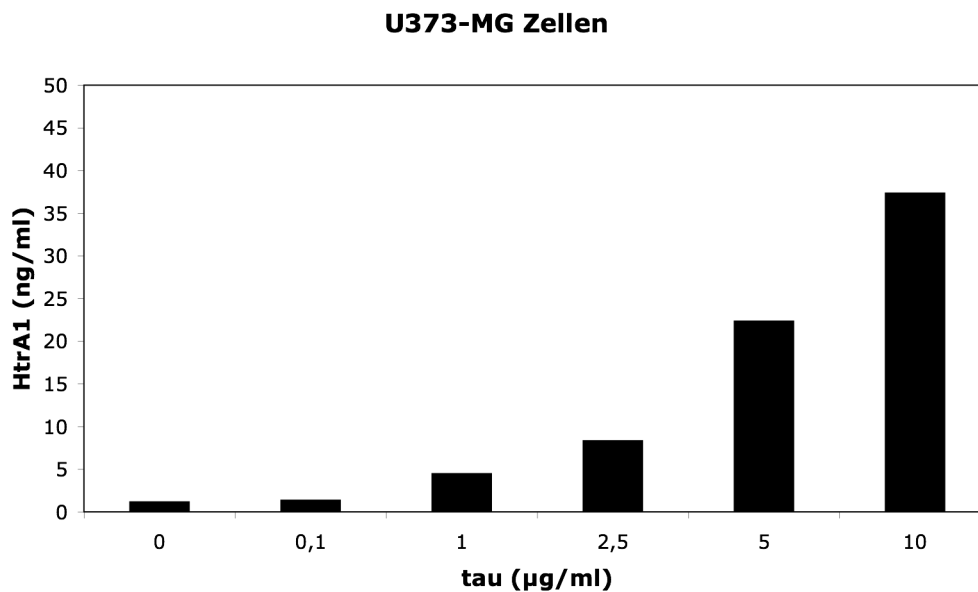


Abb. 3. 19 Die Zugabe von PHP-tau zum Zellkulturüberstand von U373-MG Zellen führt zu einem deutlichen Anstieg der HtrA1-Proteinmenge

Die Zelllinie U373-MG wurde mit unterschiedlichen Mengen an gereinigtem PHP-tau-Protein behandelt (0,1-10 µg/ml tau-Protein). Anschließend wurden die Zellen für 2 h im Begasungsbrutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die HtrA1-Proteinmenge wurde mittels HtrA1-ELISA bestimmt. Die Standardabweichung lag unter 10%.

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass eine intrazellulär und extrazellulär erhöhte tau-Proteinmenge einen Anstieg der Menge an HtrA1 zur Folge hatte. Hieraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass HtrA1 ein Teil der tau-induzierten Stressantwort ist und eine Komponente der Protein-Qualitätskontrolle bei AD.

3.1.5.5 HtrA1-RNA-Expression in U373-MG Zellen nach tau-Behandlung

Um den Effekt der tau-Behandlung auf mRNA-Ebene zu analysieren, wurde in den Zellkulturüberstand von U373-MG Zellen 2,5 µg/ml wt-tau-Protein gegeben und die HtrA1-RNA-Expression wurde zeitabhängig analysiert (2.2.14).

Das Ergebnis der HtrA1-RNA-Expressionsanalyse zeigte, dass in den tau-behandelten Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Expressionssteigerung nachgewiesen werden konnte. Sogar eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit dem tau-Protein führte zu keinem Anstieg der HtrA1-RNA-Expression. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt eine Expressionssteigerung beobachtet werden (Abb. 3. 20).

Der Anstieg der HtrA1-Proteinmenge in tau-behandelten Zellen (3.1.5.4) ist demzufolge auf Translationsebene oder Posttranslationsebene reguliert.

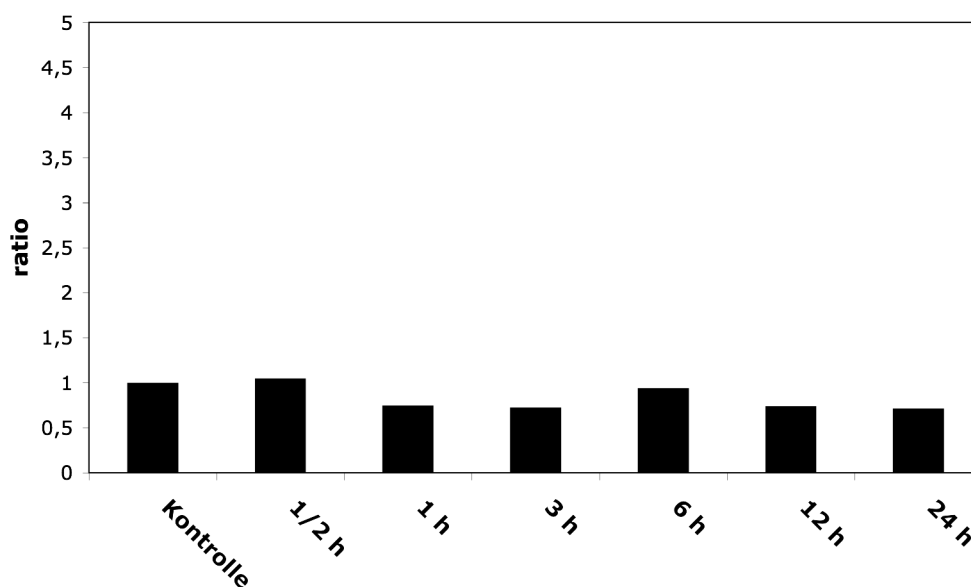


Abb. 3. 20 Untersuchung der HtrA1-RNA-Expression in tau-behandelten U373-MG Zellen

Zu dem Zellkulturüberstand von U373-MG Zellen wurden 2,5 µg/ml gereinigtes tau-wt-Protein gegeben. Anschließend wurden die Zellen im Begasungsbrutschrank inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (1/2 h – 24 h) wurde die HtrA1-RNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrolle dienten die RNA von unbehandelten Zellen. Die Standardabweichung lag unter 12%.

3.1.6 Lokalisation von HtrA1-Cherry Konstrukten in U373-MG Zellen

In früheren Arbeiten konnte in Zellen sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Lokalisation der HtrA1 Protease nachgewiesen werden (Grau *et al.*, 2005). Die subzelluläre Lokalisation und die Bedeutung der HtrA1-Domänen für die Verteilung der Protease wurden jedoch nicht untersucht. Strukturell zeichnet sich die HtrA1 Protease durch eine N-terminale Signalsequenz, eine mac25 Domäne, eine proteolytische Domäne und eine C-terminalen PDZ Domäne aus (Clausen *et al.*, 2002).

Zur Klärung der intrazellulären Lokalisation von HtrA1, wurde die Protease ohne Signalsequenz in den pmN1-Cherry Vektor kloniert, um fluoreszierende Fusionsproteine zu erhalten. Zusätzlich wurden drei weitere Konstrukte, bestehend aus verschiedenen Domänen des HtrA1-Proteins in pmN1-Cherry, kloniert. Mit Hilfe dieser Konstrukte sollte die Bedeutung der Domänen für die Lokalisation analysiert werden (Abb. 3. 21). Um zu vermeiden, dass die erhöhte Expression einer Protease zu Stress in der Zelle führt, wurde die katalytisch inaktive SA-Mutante von HtrA1 für die Klonierungen verwendet. Bei dieser Mutante ist das Serin₃₀₆ im aktiven Zentrum gegen Alanin ausgetauscht.

Δ ssHtrA1SA-Cherry



Δ mac25HtrA1SA-Cherry



Δ ss Δ PDZHtrA1SA-Cherry



PDZ-Cherry

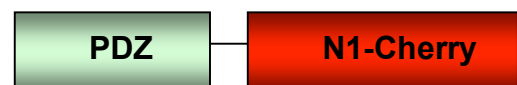


Abb. 3. 21 Schematische Darstellung der HtrA1-Cherry Konstrukte

Die Domänen der HtrA1 Protease sind farblich dargestellt: mac25-Domäne in blau, Protease-Domäne in lila, PDZ-Domäne in hell grau und der Cherry-tag in rot. Am N-Terminus des Cherry-Proteins wurden die HtrA1 Konstrukte kloniert.

3.1.6.1 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry

Die Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry wurde in U373-MG Zellen analysiert. Hierfür wurden die Zellen transient mit Δ ssHtrA1SA-Cherry transfiziert (2.4.6) und die lebenden Zellen wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops untersucht (2.4.8).

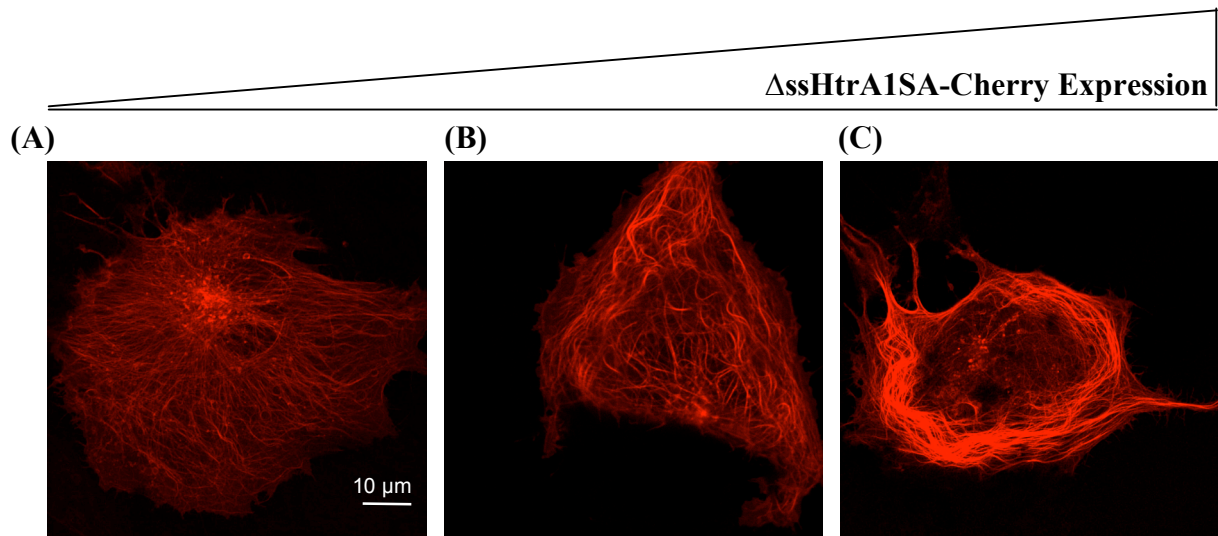


Abb. 3. 22 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry in U373-MG Zellen

Immunfluoreszenz Aufnahmen von U373-MG-Zellen nach transienter Transfektion mit dem Δ ssHtrA1SA-Cherry Konstrukt. Geringe Expression von Δ ssHtrA1SA-Cherry (A). Mittlere Expression von Δ ssHtrA1SA-Cherry (B). Erhöhte Expression von Δ ssHtrA1SA-Cherry (C).

In Abb. 3. 22 ist die Überexpression von Δ ssHtrA1-Cherry dargestellt. Die Untersuchung der transfizierten Zellen lies die Vermutung zu, dass Δ ssHtrA1-Cherry eine verstärkte Lokalisation zum Mikrotubuli-Netzwerk zeigt. Außerdem konnte Δ ssHtrA1-Cherry in vesikulären Strukturen beobachtet werden.

Die Vermutung der Mikrotubuli Lokalisation wurde durch die Tatsache gestützt, dass eine erhöhte Expression von Δ ssHtrA1-Cherry zu einer Bündelung des Mikrotubuli-Netzwerkes führte. Bedingt durch diese Bündelung wirkten stark überexpremierende Δ ssHtrA1-Cherry Zellen kleiner und runder und wiesen somit eine veränderte Zellmorphologie auf. In der Literatur wurden bereits einige Mikrotubuli lokalisierte Proteine beschrieben, welche bei Überexpression eine Bündelung des Mikrotubuli-Netzwerkes zur Folge hatten (Faller und Brown, 2009).

Um zu klären, ob Δ ssHtrA1-Cherry tatsächlich eine Lokalisation zu Tubulin aufweist, wurden transfizierte Zellen fixiert, permeabilisiert und Tubulin wurde angefärbt.

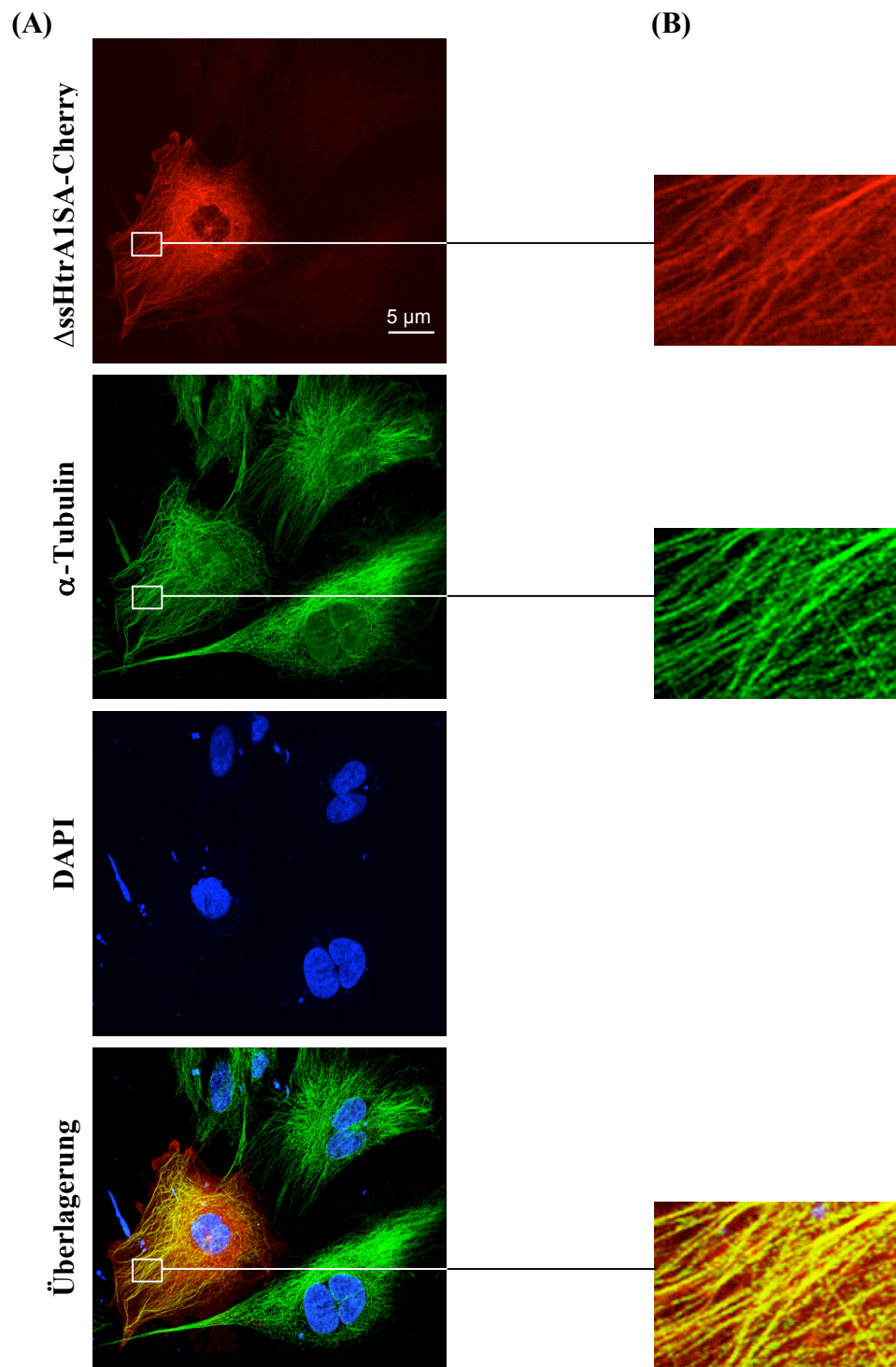


Abb. 3. 23 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry in Tubulin angefärbten U373-MG Zellen

U373-MG Zellen wurden mit dem Δ ssHtrA1SA-Cherry Konstrukt (rot) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, das Tubulin (anti- α -Tubulin, Alexa488-gekoppelter Sekundärantikörper) wurde angefärbt (grün), der Kern wurde DAPI gefärbt (blau) und Immunfluoreszenz Aufnahmen wurden durchgeführt. Überlagerungen von rot und grün sind gelb dargestellt. Ganze Zellen (A). Vergrößerung der Tubulin-Struktur (B).

Die Untersuchung der transfizierten Zellen mit dem konfokalen Lasermikroskop zeigte, dass Δ ssHtrA1SA-Cherry und Tubulin ähnliche Strukturen aufwiesen, wobei geringe Mengen von HtrA1 auch an der Plasmamembran lokalisiert waren und in vesikulären Strukturen vorkamen (Abb. 3. 23 A). Die Lokalisation von Δ ssHtrA1-Cherry zum Mikrotubuli-Netzwerk wurde mittels eines gelben Signals in der Überlagerung nachgewiesen. Zusätzlich konnte mit Hilfe eines vergrößerten Ausschnitts des Mikrotubuli-Netzwerkes diese Lokalisation verdeutlicht werden (Abb. 3. 23 B).

Ein anderes Bild zeigte sich, wenn Δ ssHtrA1-Cherry in transfizierten U373-MG Zellen mit Aktin verglichen wurden. In diesen Zellen konnte keine Lokalisation von Δ ssHtrA1-Cherry zum Aktin-Netzwerk festgestellt werden, sondern Δ ssHtrA1-Cherry zeigte erneut eine Tubulin ähnliche Struktur. Wie erwartet führte eine erhöhte Δ ssHtrA1SA-Cherry Expression nicht zu der Bündelung des Aktin-Netzwerkes (Abb. 3. 24). Im Gegensatz dazu konnte in Abb. 3. 22 deutlich gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von HtrA1 zu einer Stabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes führte.

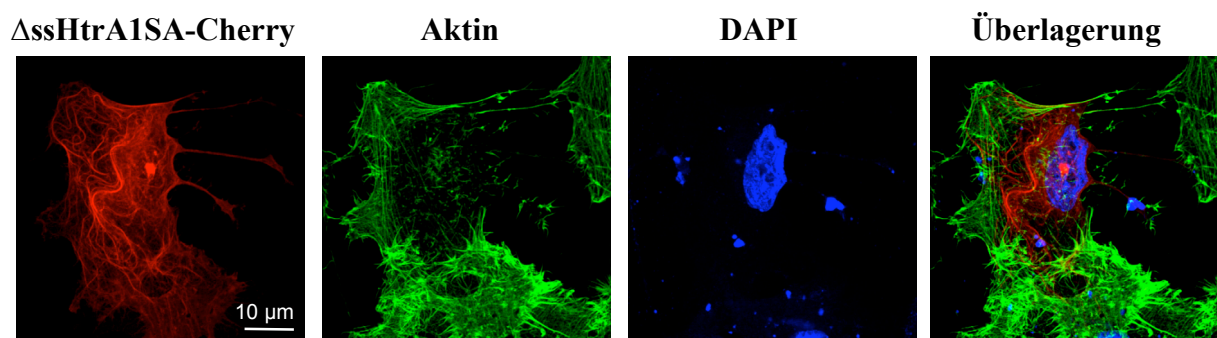


Abb. 3. 24 Lokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry in Aktin angefärbten U373-MG Zellen

Immunfluoreszenz Aufnahmen von U373-MG-Zellen nach transients Transfektion mit dem Δ ssHtrA1SA-Cherry Konstrukt (rot). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die Aktinzytoskelettstruktur wurde mit 488-markiertem Phalloidin angefärbt (grün) und der Kern wurde DAPI gefärbt (blau).

3.1.6.2 Koexpressionsstudien von Δ ssHtrA1SA-Cherry und tau-GFP in U373-MG Zellen

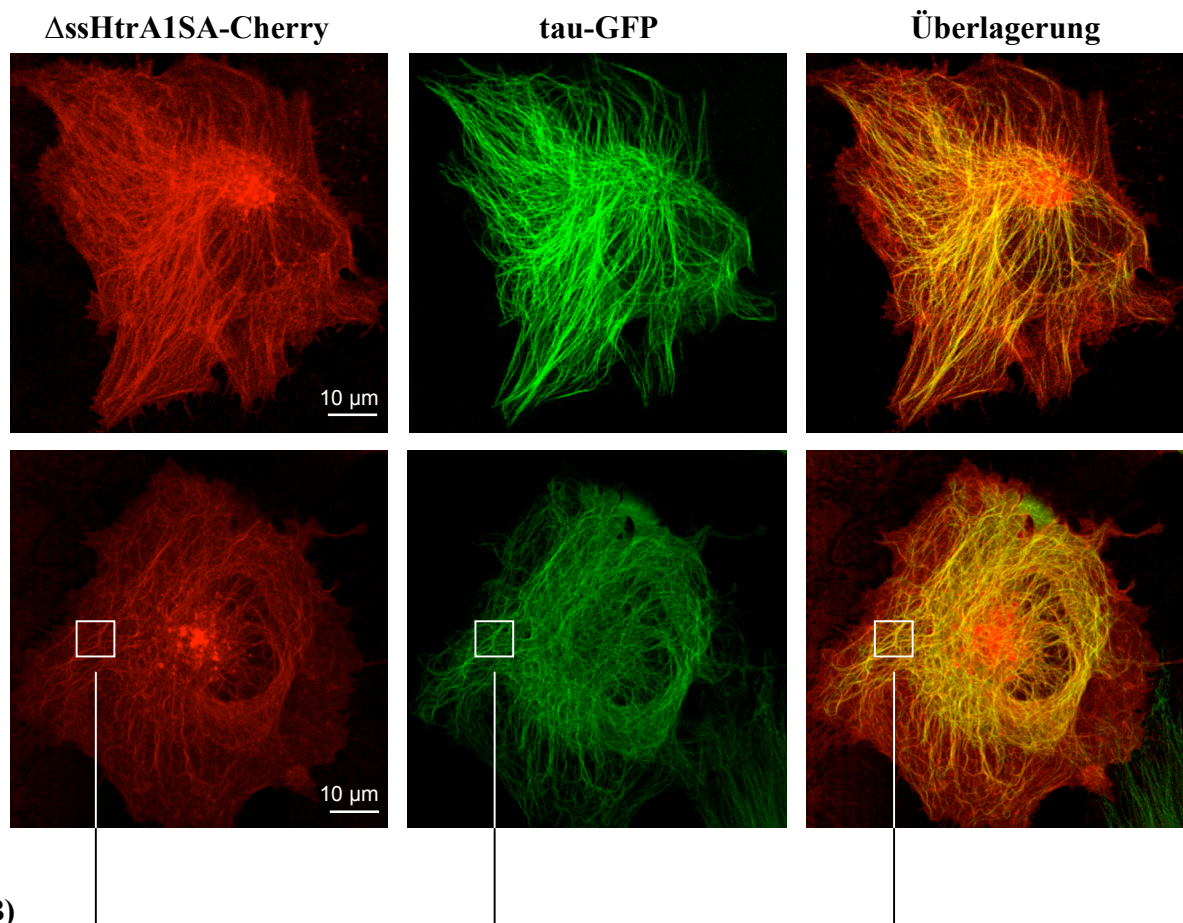
In früheren Studien wurde das tau-Protein als ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein beschrieben (Weingarten *et al.*, 1975). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HtrA1 ebenfalls eine Lokalisation zum Mikrotubuli-Netzwerk aufweist. Anhand dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Proteine in der Zelle kolokalisiert sind.

Die gleichzeitige Expression von Δ ssHtrA1-Cherry und tau-GFP sollte diese Vermutung unterstützen. Hierfür wurden U373-MG Zellen mit Δ ssHtrA1SA-Cherry und tau-GFP¹ transient kotransfiziert und die Lokalisation der beiden Proteine wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops untersucht.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten deutlich, dass HtrA1 und tau kolokalisiert in den Zellen vorkamen (Abb. 3. 25 A). Mit Hilfe eines vergrößerten Ausschnitts der Zelle konnte die Kolokalisation der Proteine verdeutlicht werden (Abb. 3. 25 B). Wie erwartet wiesen beide Proteine eine Tubulin ähnliche Struktur auf. Zusätzlich konnte in vielen Zellen eine vesikuläre Struktur von Δ ssHtrA1-Cherry beobachtet werden, jedoch nicht für tau-GFP.

¹ freundlicherweise von Prof. Dehmelt, Max-Planck-Institut (MPI) Dortmund, zur Verfügung gestellt

(A)



(B)

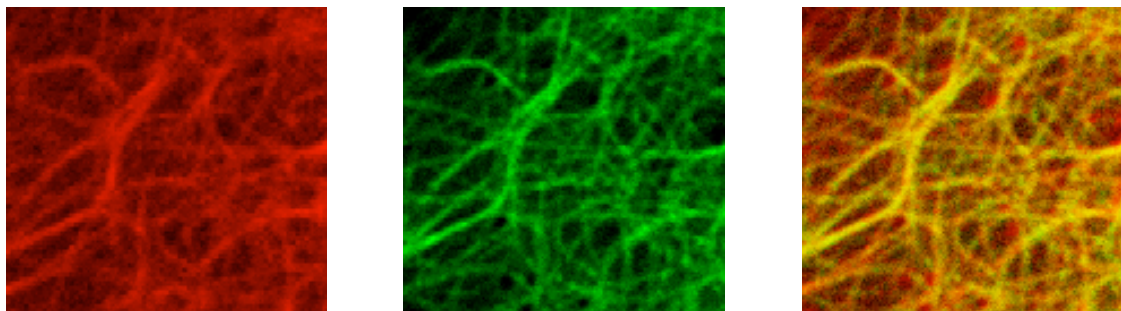


Abb. 3. 25 Kolokalisation von Δ ssHtrA1SA-Cherry und tau-GFP in U373-MG Zellen

U373-MG Zellen wurden mit Δ ssHtrA1SA-Cherry (rot) und tau-GFP (grün) kotransfiziert. Nach 24 h wurden Aufnahmen von den Zellen mit Hilfe eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops durchgeführt. Überlagerungen von rot und grün sind gelb dargestellt. Transient transfizierte U373-MG Zellen (A). Vergrößerter Ausschnitt einer Zelle (B).

3.1.6.3 Lokalisation von $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -, $\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ - und PDZ-Cherry

Im folgenden sollte untersucht werden, welche Domäne von HtrA1 für die Lokalisation des Proteins entscheidend ist. Hierfür wurden drei weitere HtrA1-Cherry Konstrukte hergestellt. Beim ersten Konstrukt wurde HtrA1 ohne die mac25 Domäne in das Cherry-Plasmid kloniert ($\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry). Da neben dem nativen HtrA1-Protein auch diese verkürzte Variante intrazellulär nachweisbar ist, ist die subzelluläre Lokalisation dieser Variante von großem Interesse (Chien *et al.*, 2006).

Um die Lokalisation von $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry zu untersuchen, wurden U373-MG Zellen mit $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry transfiziert und die lebenden Zellen wurden mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie untersucht. In Abb. 3. 26 A kann man deutlich erkennen, dass $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry ebenfalls eine Lokalisation zum Mikrotubuli-Netzwerk zeigte. Zusätzlich konnte $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry in vesikulären Strukturen beobachtet werden. Demzufolge zeigt die verkürzte Variante die gleiche Lokalisation wie das native Protein.

Um die Bedeutung der PDZ-Domäne für die Lokalisation von HtrA1 zu analysieren, wurden zwei weitere HtrA1-Konstrukte kloniert. Bei einem Konstrukt wurde die mac25 und Protease Domäne in das Cherry-Plasmid kloniert ($\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ -Cherry) und bei dem anderen Konstrukt wurde die PDZ Domäne (PDZ-Cherry) in den Vektor kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte transient in U373-MG Zellen transfiziert und die lebenden Zellen wurden untersucht.

(A) $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry (B) $\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ -Cherry (C) PDZ-Cherry

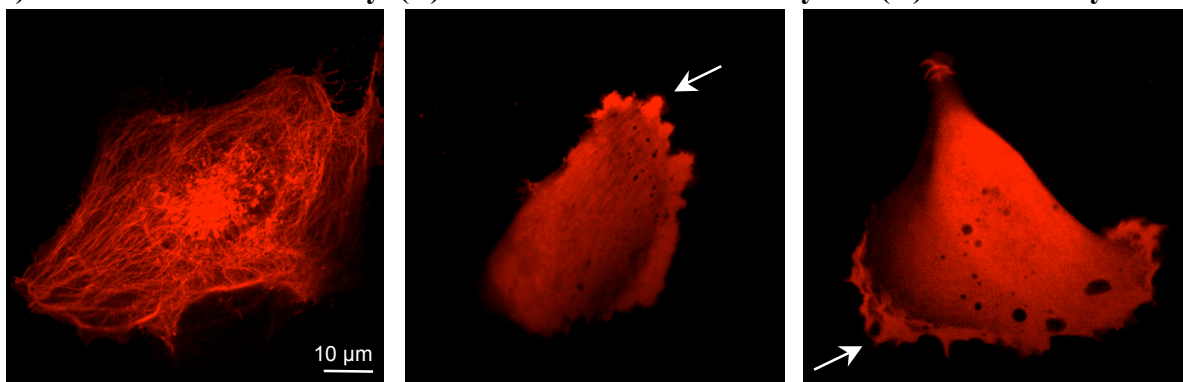


Abb. 3. 26 Expression von $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry, $\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ -Cherry und PDZ-Cherry in U373-MG Zellen

U373-MG Zellen wurden mit $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry (A), $\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ -Cherry (B) und PDZ-Cherry (C) transient transfiziert, nach 24 h wurden Aufnahmen von den lebenden Zellen mit Hilfe eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops durchgeführt. Verstärkte Lokalisationen an der Plasmamembran sind mit weißen Pfeilspitzen dargestellt.

Im Gegensatz zu dem $\Delta\text{mac25HtrA1SA}$ -Cherry Konstrukt zeigten das $\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ -Cherry und das PDZ-Cherry Konstrukt eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung in den U373-MG Zellen. Teilweise konnte eine verstärkte Lokalisation der beiden Konstrukte an der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 3.26 B und C). Interessanterweise konnte diese Beobachtung sowohl bei $\Delta\text{ss}\Delta\text{PDZHtrA1SA}$ -Cherry als auch bei PDZ-Cherry festgestellt werden, wodurch keine Aussage über die Bedeutung der PDZ Domäne für die Lokalisation getroffen werden kann.

3.1.7 Untersuchungen der HtrA1- und der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Um die funktionelle Relevanz von HtrA1 weiter zu untersuchen, wurde Gehirngewebe von AD Patienten und von nicht AD Patienten, im Folgendem als Kontrollen bezeichnet, analysiert. Die Untersuchung der Gehirngewebe sollte klären, ob eine veränderte HtrA1-RNA-Expression und HtrA1-Proteinmenge mit der Erkrankung einherging. Außerdem sollte geklärt werden, ob die HtrA1-Proteinmenge mit der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe korreliert und ob Rückschlüsse über die Bedeutung der Protease bei AD getroffen werden können. Hierfür wurde von 29 AD Patienten und von 24 Kontrollen Gehirngewebe aus dem frontalen Kortex entnommen und untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass nur sporadische AD Fälle mit spätem Erkrankungsbeginn (*late onset* AD, LOAD; Erkrankungsalter ≥ 65 Jahre) untersucht wurden. Von allen Patienten waren Informationen zum Erkrankungsalter, Untersuchungsalter und Geschlecht vorhanden.

¹ freundlicherweise von Prof. Egensperger, Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung, Universität München, zur Verfügung gestellt

3.1.7.1 HtrA1-RNA-Expression in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Um zu untersuchen, ob eine veränderte HtrA1-RNA-Expression mit der Erkrankung an AD einhergeht, wurde aus dem Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen die RNA isoliert (2.2.12), in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR wurde die HtrA1-RNA-Expression analysiert (2.2.14). Anschließend wurden die Daten mit Hilfe des Student's t-test ausgewertet.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse zeigte, dass bei AD Patienten, im Vergleich zu den Kontrollen, eine erhöhte HtrA1-RNA-Expression bestimmt werden konnte. Da ein p-Wert $< 0,05$ ermittelt wurde, kann dieses Ergebnis als signifikant angesehen werden. Die Erkrankung an AD hatte somit eine 2-fach erhöhte HtrA1-RNA-Expression zur Folge (Abb. 3. 27).

Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass HtrA1 eine Komponente der Protein-Qualitätskontrolle bei AD ist.

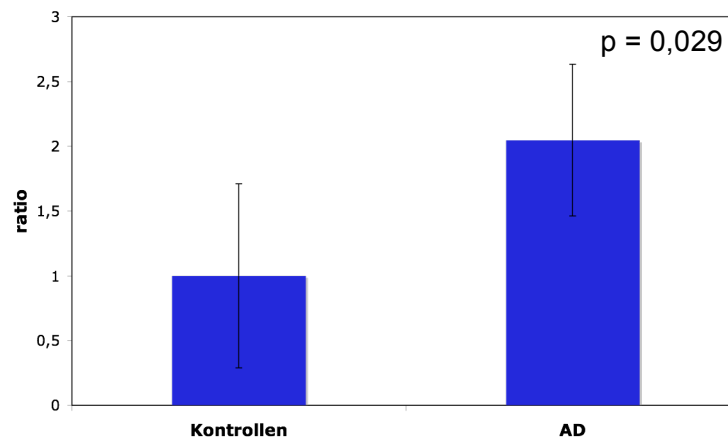


Abb. 3. 27 Expressionsanalyse von HtrA1 in Gehirngewebe

Die HtrA1-RNA-Expression wurde quantitativ mittels qRT-PCR in Gehirngewebe analysiert. Untersucht wurden 24 Kontrollen und 29 AD Patienten. Die Standardabweichung wurde berechnet und in der Graphik dargestellt. Der p-Wert (p) wurde mittels Student's t-Test bestimmt.

3.1.7.2 HtrA1-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Der Nachweis der erhöhten HtrA1-RNA-Expression bei AD Patienten sollte anschließend auf Proteinebene analysiert werden. Hierfür wurde in den Gehirngeweben der Patienten die Proteine mittels Ameisensäurebehandlung extrahiert (2.3.13). Diese Behandlung war notwendig, damit die Proteine aus den A β -Plaques und den neurofibrillären Bündel isoliert werden konnten und in Lösung vorlagen. Anschließend wurde ein spezifischer ELISA durchgeführt, um HtrA1 quantitativ zu bestimmen (2.3.14).

Im Gegensatz zu der HtrA1-RNA-Expression lieferte die Bestimmung der HtrA1-Proteinmenge kein eindeutiges Ergebnis. Die Proteinmenge war zwar bei den AD Patienten im Vergleich zu den Kontrollen um den Faktor 1,3 erhöht, diese Erhöhung konnte jedoch nicht als signifikant angesehen werden, da die Auswertung der Daten mittels Student's t-Test einen p-Wert $> 0,05$ ergab. Demzufolge konnte lediglich eine erhöhte Tendenz der HtrA1-Proteinmenge bei den AD Patienten bestimmt werden (Abb 3. 28).

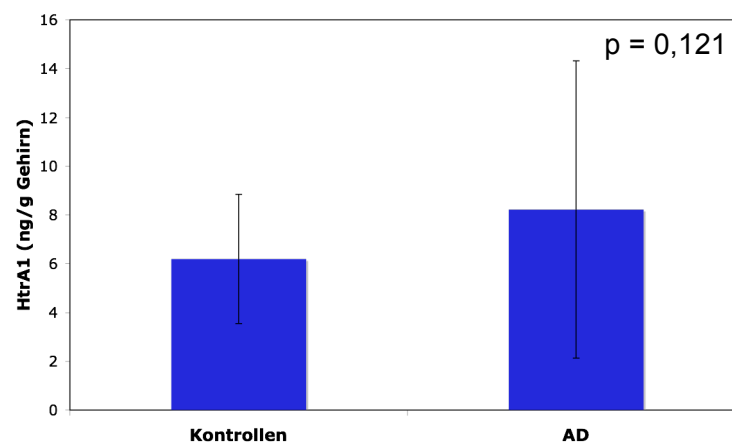


Abb. 3. 28 Quantitative Bestimmung der HtrA1-Proteinmenge in Gehirngewebe

Aus dem frontalen Kortex von 29 AD Patienten und 24 Kontrollen wurde Gehirngewebe isoliert und die Proteine wurden extrahiert. Die HtrA1-Proteinmenge wurde quantitativ mittels HtrA1-ELISA ermittelt. Die durchschnittliche HtrA1-Proteinmenge der Proben wurde bestimmt und die Standardabweichung wurde berechnet und in der Graphik dargestellt. Der p-Wert (p) wurde mittels Student's t-Test bestimmt.

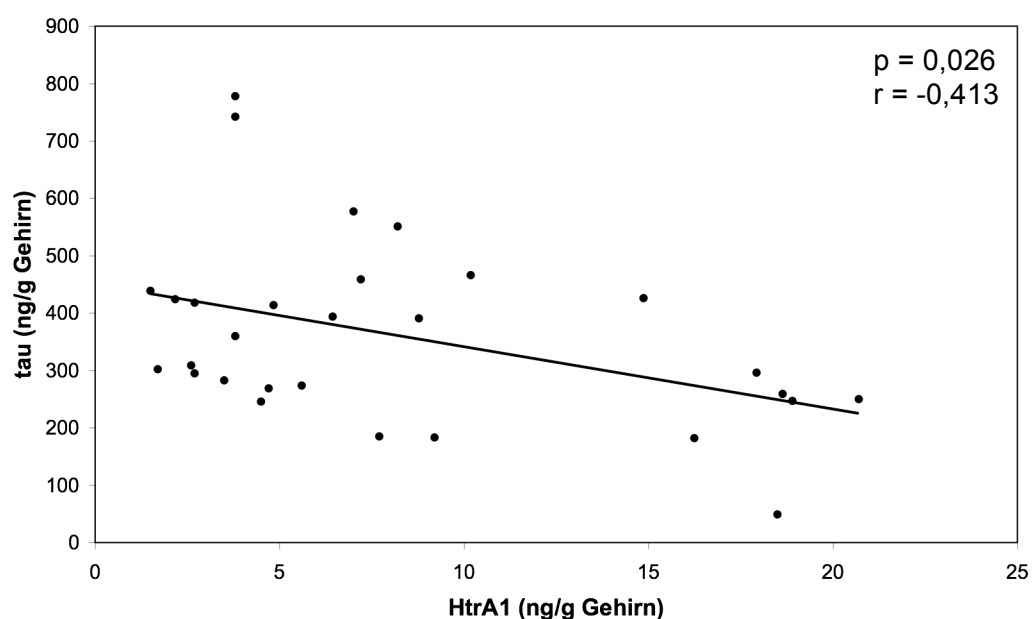
3.1.7.3 Korrelation zwischen der HtrA1- und der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Im folgendem sollte die Relevanz der HtrA1 Protease für den Abbau des tau-Proteins in Gehirngewebe analysiert werden. Hierfür wurde untersucht, ob in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge mit einer reduzierten tau-Proteinmenge korreliert. Könnte dieser Nachweis erbracht werden, würde die Hypothese, dass HtrA1 eine wirksame tau Protease ist, gestützt werden.

Zunächst wurde in den Gehirngeweben, in denen bereits die HtrA1-Proteinmenge ermittelt wurde (3.1.7.2), die tau-Proteinmenge quantitativ bestimmt (2.3.16). Anschließend wurde die HtrA1-Proteinmenge gegen die tau-Proteinmenge graphisch aufgetragen (Abb. 3. 29) und der Korrelationskoeffizient wurde mit Hilfe des Auswertungsprogramms „Graph Prism5“ ermittelt. Bei dieser Auswertungsmethode wird der p-Wert und der Pearson r-Wert berechnet. Ein p-Wert $< 0,05$ zeigt eine signifikante Korrelation der beiden Proben an, wobei ein signifikanter p-Wert aussagt, dass die Korrelation nicht per Zufall entstehen konnte. Ein p-Wert $\geq 0,05$ sagt aus, dass die Proben nicht korrelieren.

Zusätzlich wurde der Pearson r-Wert berechnet. Ein negativer Pearson r-Wert gibt an, dass eine Proteinmenge sinkt während die andere Proteinmenge steigt. Ein positiver Pearson r-Wert gibt hingegen an, dass beide Proteinmengen gleichzeitig sinken oder steigen.

(A)



(B)

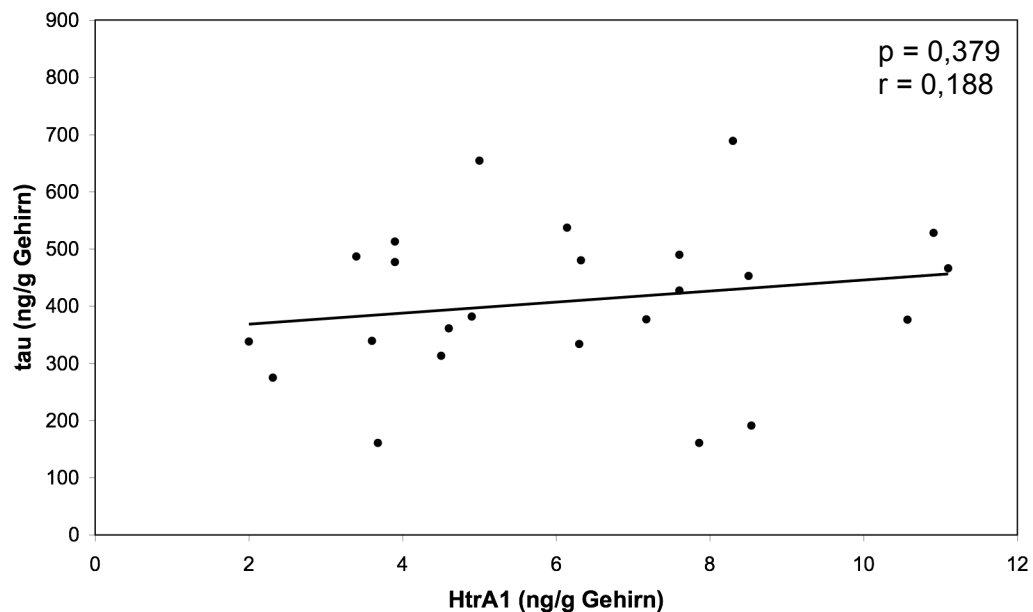


Abb. 3. 29 Quantifizierung der HtrA1- und der tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Die HtrA1- und tau-Proteinmenge wurde mittels spezifischen ELISAs ermittelt. Untersucht wurden 29 AD Patienten (A) und 24 Kontrollen (B). Anschließend wurden die Proteinmengen gegeneinander aufgetragen und mit der Software „GraphPad Prism5“ wurde der Korrelationskoeffizient berechnet (p-Wert (p) und Pearson r-Wert (r)).

Mit Hilfe des ermittelten Korrelationskoeffizienten konnte bei den AD Patienten ein signifikanter p-Wert ($p = 0,026$) und ein negativer Pearson r-Wert ($r = -0,413$) bestimmt werden. Somit führte eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer reduzierten tau-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten (Abb. 3. 29 A). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den in dieser Arbeit analysierten biochemischen und zellbiologischen Daten, anhand derer HtrA1 bereits als tau Protease beschrieben werden konnte.

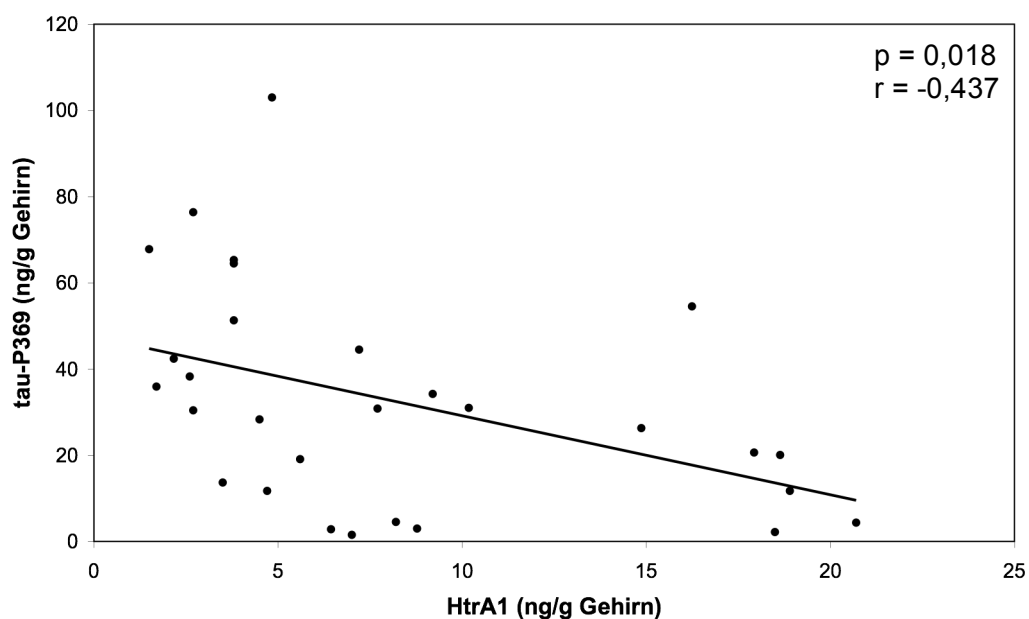
Ein gegenteiliges Ergebnis wurde beim ermittelten Korrelationskoeffizienten der Kontrollen bestimmt. Bei diesen Proben wurde kein signifikanter p-Wert ($p = 0,379$) und ein positiver Pearson r-Wert ($r = 0,188$) ermittelt. Demzufolge führte bei den Kontrollen eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge nicht zu einer reduzierten tau-Proteinmenge (Abb. 3. 29 B).

3.1.7.4 Korrelation zwischen der HtrA1- und der tau-P396-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine Hyperphosphorylierung des tau-Proteins zu den Hauptmerkmalen von AD zählt (Lee *et al.*, 1991; Iqbal und Grundke-Iqbal, 1996). Eine wirksame tau Protease müsste deshalb in der Lage sein, hyperphosphoryliertes tau in Gehirngewebe zu reduzieren. Um HtrA1 als eine solche tau Protease zu charakterisieren wurde untersucht, ob eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge mit einer reduzierten phosphorylierten tau-Proteinmenge korreliert.

Hierfür wurde die Phosphorylierungsstelle-396 des tau-Proteins, mittels eines spezifischen ELISAs, quantitativ bestimmt. Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurden die ermittelten tau-P396-Proteinmengen gegen die HtrA1-Proteinmengen aufgetragen. Die 396-Stelle des tau-Proteins wird von der GSK-3 β phosphoryliert. Da die GSK-3 β im Verlauf von AD aktiviert wird und als Folge dieser Aktivierung das tau-Protein phosphoryliert, dient die phosphorylierte 396-Stelle als gute Nachweismethode für an AD erkrankte Gehirne (Takashima *et al.*, 1996).

(A)



(B)

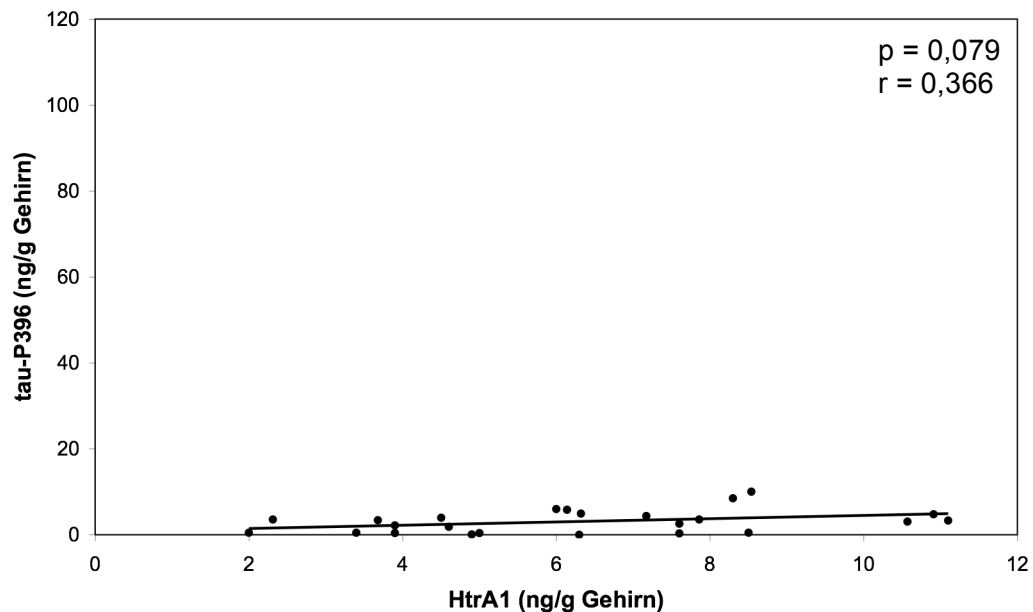


Abb. 3. 30 Quantifizierung der HtrA1- und der tau-P396-Proteinmengen in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Die HtrA1 und tau-P396-Proteinmenge wurde quantitativ mittels spezifischen ELISAs ermittelt, die Proteinmengen wurden gegeneinander aufgetragen und der Korrelationskoeffizient (p-Wert (p) und Pearson r-Wert (r)) wurde bestimmt mit Hilfe der Software „GraphPad Prism5. Untersucht wurden 29 AD Patienten (A) und 24 Kontrollen (B).

Die Korrelationsstudie der HtrA1-Proteinmenge mit der tau-P396-Proteinmenge ist in Abb. 3. 30 dargestellt. Bei den AD Patienten konnte ein signifikanter p-Wert ($p = 0,018$) und einen negativer Pearson r-Wert ($r = -0,437$) ermittelt werden, wodurch gezeigt wurde, dass eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge mit einer reduzierten tau-P396-Proteinmenge in einem statistisch signifikanten Verhältnis korreliert (Abb. 3. 30 A).

Im Gegensatz zu den AD Patienten konnte bei den Kontrollen die zu erwartende geringe Menge an phosphoryliertem tau bestimmt werden. Mittels Korrelationsstudie konnte bei den Kontrollen kein signifikanter p-Wert ($p = 0,079$) und ein positiver Pearson r-Wert ($r = 0,366$) ermittelt werden. Somit führte eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge in den Kontrollen nicht zu einer reduzierten tau-P396-Proteinmenge (Abb. 3. 30 B).

In Gehirngewebe von AD Patienten führt demzufolge eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer verminderten Anreicherung des nativen und hyperphosphorylierten tau-Proteins. Somit kann die Hypothese unterstützt werden, dass HtrA1 eine wirksame tau Protease ist, welche eine Komponente der Protein-Qualitätskontrolle bei AD ist.

3.2 Bedeutung des *HTRA1* Promotor Polymorphismus bei AD

Genetische Studien haben einen Abschnitt auf Chromosom 10 identifiziert (10q21-10q26), welcher mit dem Risiko an AD zu erkranken in Verbindung gebracht werden konnte. In dieser Region befindet sich an Position 10q26 das *HTRA1*-Gen (Bertram *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002b). Interessanterweise wurde in der Promotorregion des *HTRA1*-Gens ein einzelner Nukleotid Polymorphismus (SNP; rs11200638) beschrieben, welcher mit dem Risiko an altersbedingter Makuladegeneration (AMD) zu erkranken assoziiert wurde (Dewan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

Aufgrund gemeinsamer pathologischer Charakteristika von AD und AMD (Hageman *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Luibl *et al.*, 2006), sollte im folgenden untersucht werden, ob der SNP mit einem erhöhtem Risiko an AD zu erkranken in Verbindung gebracht werden kann und ob der SNP zu einem veränderten *HtrA1*-Expressionsevel führt. Hierfür wurden sporadische AD Fälle mit spätem Erkrankungsbeginn (Erkrankungsalter ≥ 65 Jahre), welche die Mehrheit der betroffenen Patienten repräsentiert, untersucht. Von allen Patienten waren Informationen zum Erkrankungsalter, Untersuchungsalter und Geschlecht vorhanden.

3.2.1 Nachweis des SNP rs11200638 im *HTRA1*-Promotor

Um den Polymorphismus im *HTRA1*-Promotor nachzuweisen, wurde aus 20 mg Gehirngewebe die DNA isoliert (2.2.15) und mittels RFLP-Analyse wurde der Polymorphismus untersucht (2.2.16).

Bei der RFLP-Analyse nutzt man die Tatsache aus, dass ein Restriktionsenzym eine spezifische palindromische Sequenz in der DNA erkennt und schneidet. Kommt es zu dem Austausch einer einzigen Base, kann das Enzym den Schnitt nicht mehr durchführen. Im Fall des hier analysierten SNP rs11200638 kommt es zum Austausch von Guanin gegen Adenin im *HTRA1*-Promotor. Dieser Austausch führt dazu, dass das Restriktionsenzym *Bst*ZI nicht mehr in Lage ist ein PCR-Produkt, welches diesen Abschnitt der DNA enthält, zu schneiden (Abb. 3. 31).

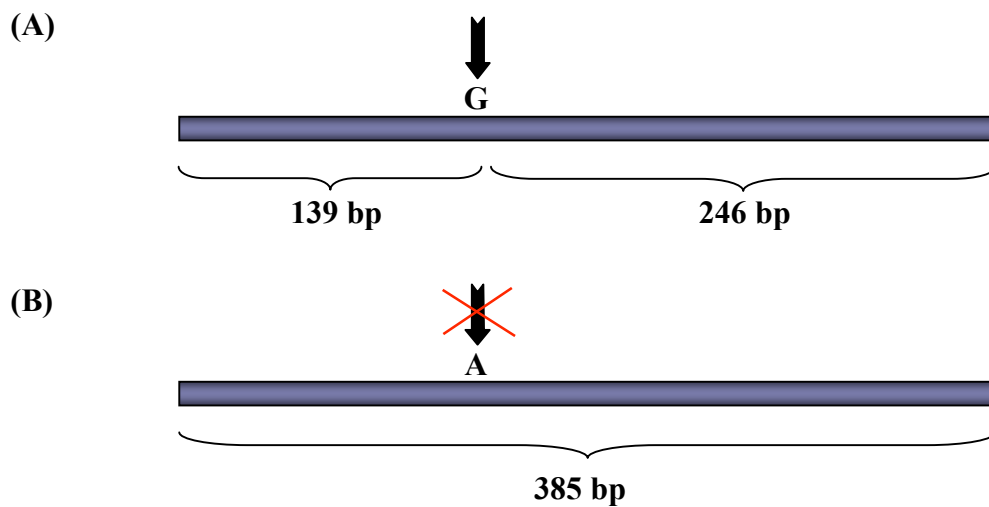


Abb. 3. 31 Schematische Darstellung des SNPs im HtrA1-PCR-Produkt

Der Verdau des HtrA1 PCR-Produkts, mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bst*ZI, führt zu der Entstehung von zwei Fragmenten (139 bp und 246 bp) (A). Beim Auftreten des SNPs kommt es zum Austausch von Guanin (G) gegen Adenin (A), wodurch das Restriktionsenzym nicht mehr die DNA schneiden kann. Demzufolge kann nur das PCR-Produkt nachgewiesen werden (385 bp) (B).

Der menschliche Organismus besitzt einen doppelten Chromosomensatz, somit sind jeweils zwei Allele eines Gens vorhanden. Bezüglich des SNPs können deshalb drei Genotypen bestimmt werden (GG-, GA- und AA-Genotyp) und die RFLP-Analyse führt zu der Entstehung von drei unterschiedlichen Schnittmustern. Demzufolge können beim GG-Genotyp zwei Banden (139 und 246 bp), beim GA-Genotyp drei Banden (139, 246 und 385 bp) und beim AA-Genotyp eine Bande (385 bp) nachgewiesen werden. Die Analyse des Genotyps einiger Patienten ist in Abb. 3. 32 dargestellt.

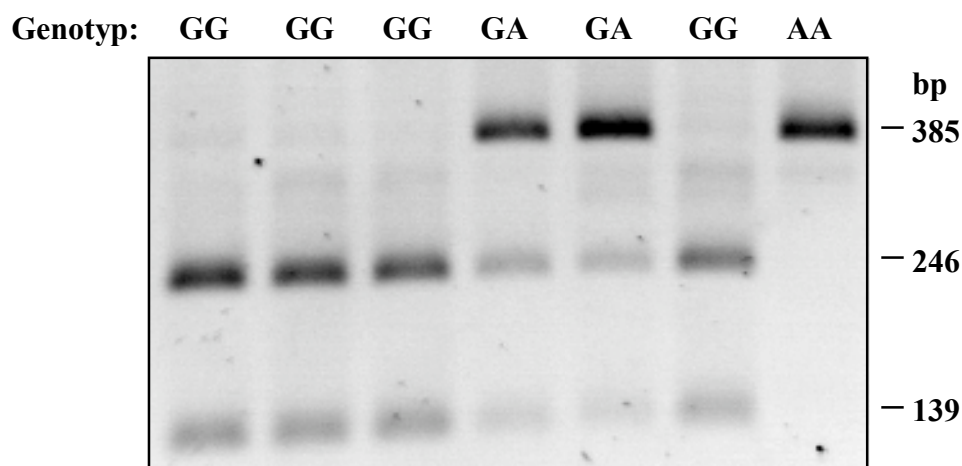


Abb. 3. 32 Bestimmung des Genotyps der Patienten mittels RFLP-Analyse

Die PCR-Produkte wurden mit dem *Bst*ZI Restriktionsenzym inkubiert und die entstehenden Fragmente wurden in einem 2,5% Agarosegel getrennt. Eine Differenzierung des Genotyps wurde über die Anzahl der Banden vorgenommen: GG-Genotyp (246 bp und 139 bp), GA-Genotyp (385 bp, 246 bp und 139 bp), AA-Genotyp (385 bp).

Das Ergebnis der Genotypisierung zeigte, dass der GG-Genotyp am häufigsten, der GA-Genotyp am zweit häufigsten und der AA-Genotyp am seltensten nachgewiesen wurde. Anhand der Häufigkeit mit der das A-Allel bei den Kontrollen bestimmt wurde, konnte kein erhöhtes Risiko an AD zu erkranken mit dem Polymorphismus in Verbindung gebracht werden (Tab. 3. 2).

Tab. 3. 2 Genotyp-Bestimmung bei AD Patienten und Kontrollen

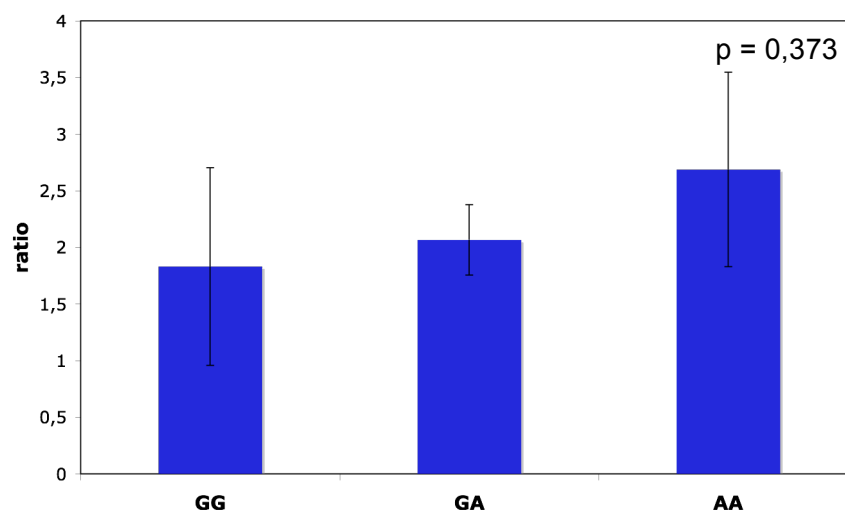
Der Genotyp wurde bei 29 AD Patienten und 24 Kontrollen mittels RFLP-Analyse bestimmt.

| Genotyp | AD Patienten | Kontrollen |
|---------|--------------|------------|
| GG | 18 | 12 |
| GA | 9 | 11 |
| AA | 2 | 1 |

3.2.2 Effekt des SNP rs11200638 auf die HtrA1-RNA-Expression

Um die funktionelle Relevanz des SNPs in der Promotorregion des *HTRAI*-Gens zu untersuchen wurde analysiert, ob der Genotyp einen Einfluss auf die HtrA1-RNA-Expression hatte. Hierfür wurde die Expression des *HTRAI*-Gens in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt (2.2.14). Die Patienten wurden in ihre jeweiligen Genotypen unterteilt und die Daten wurden mit Hilfe des ANOVA Programms ausgewertet.

(A)



(B)

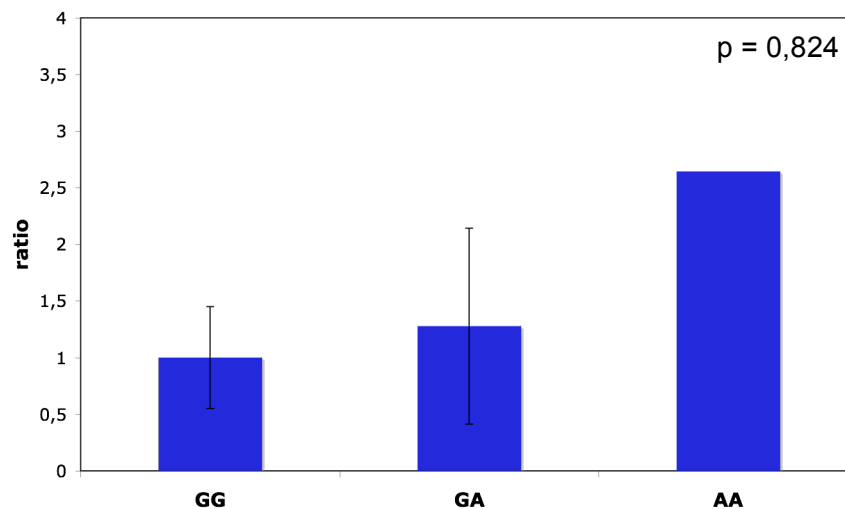


Abb. 3. 33 Einfluss des SNPs auf die HtrA1-RNA-Expression in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Die HtrA1-RNA-Expression wurde bei 29 AD Patienten (A) und 24 Kontrollen (B) quantitativ mittels qRT-PCR im frontalen Kortex ermittelt. Die Patienten wurden in ihre Genotypen unterteilt und die Standardabweichung in die Graphik integriert. Da bei den Kontrollen nur ein einziger AA-Genotyp bestimmt wurde, konnte keine Standardabweichung ermittelt werden. Mit Hilfe des ANOVA Programms der Software „GraphPad Prism5“ wurde der p-Wert (p) bestimmt.

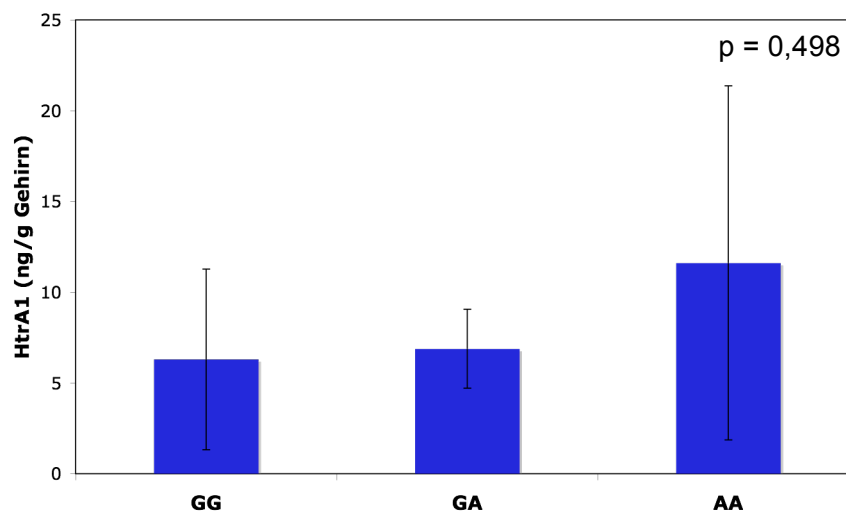
Das Ergebnis der Expressionsanalyse zeigte, dass der SNP keinen signifikanten Einfluss auf die HtrA1-RNA-Expression hatte, da bei den AD Patienten und bei den Kontrollen ein p-Wert $> 0,05$ ermittelt wurde.

Lediglich beim AA-Genotyp konnte eine leicht erhöhte Expression des *HTRA1*-Gens bestimmt werden. Da jedoch die Anzahl der untersuchten Patienten gering war, kann hier nur von einer Tendenz gesprochen werden (Abb. 3. 33).

3.2.3 Effekt des SNP rs11200638 auf die HtrA1-Proteinmenge

Um den Effekt des SNP rs11200638 auf die HtrA1-Proteinmenge zu analysieren, wurden die AD Patienten und Kontrollen in ihre Genotypen unterteilt und mittels spezifischen HtrA1-ELISA wurde die Proteinmenge quantitativ in Gehirngewebe bestimmt (2.3.14). Anschließend wurden die ermittelten Daten mit Hilfe des ANOVA Programms ausgewertet.

(A)



(B)

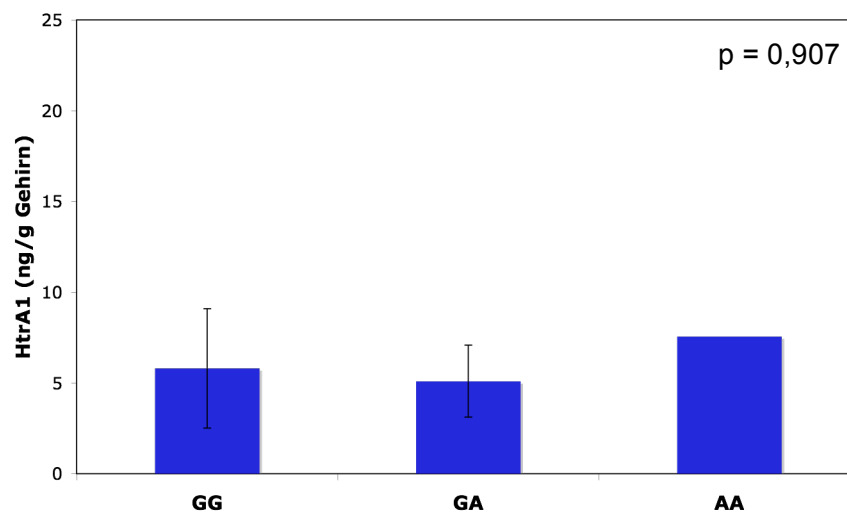


Abb. 3. 34 Einfluss des SNPs auf die HtrA1-Proteinmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Die HtrA1-Proteinmenge wurde bei 29 AD Patienten (A) und 24 Kontrollen (B) quantitativ mittels HtrA1-ELISA im frontalen Kortex ermittelt. Die Patienten wurden in ihre Genotypen unterteilt und die Standardabweichung in die Graphik integriert. Da bei den Kontrollen nur ein einziger AA-Genotyp bestimmt wurde, konnte keine Standardabweichung ermittelt werden. Mit Hilfe des ANOVA Programms der Software „GraphPad Prism5“ wurde der p-Wert (p) bestimmt.

Abb. 3. 34 zeigt, dass der SNP keinen Effekt auf die HtrA1-Proteinmenge hatte, da sich die ermittelten HtrA1-Proteinmengen der Genotypen, sowohl bei den AD Patienten als auch bei den Kontrollen, nicht signifikant unterschieden (p-Wert > 0,05).

Beim AA-Genotyp konnte lediglich eine erhöhte Tendenz der HtrA1-Proteinmenge festgestellt werden. Dies stimmt mit dem Ergebnis der HtrA1-RNA-Expressionsanalyse überein (3.2.2). Um jedoch eine Aussage über die Bedeutung des AA-Genotyps im Bezug auf AD treffen zu können müssten mehrere Proben analysiert werden.

3.3 Der Einfluss der HtrA1-Proteinmenge auf die Anreicherung des A β -Peptids in Gehirngewebe

Die Ablagerungen des A β -Peptids in verschiedenen Gehirnarealen des Menschen zählen neben den Ablagerungen des tau-Proteins zu den pathologischen Hauptkennzeichen bei AD (Selkoe, 2001b; Mandelkow *et al.*, 2007). In unserer Arbeitsgruppe konnte HtrA1 *in vitro* bereits als wirksame A β Protease charakterisiert werden (Grau *et al.*, 2005). Um die funktionelle Relevanz der HtrA1 Protease im Bezug auf das A β -Peptid und seine Ablagerungen weiter zu analysieren, wurden Korrelationsstudien der HtrA1-Proteinmenge und der A β -Peptidmenge in humanen und murinen Gehirngeweben durchgeführt. Mit Hilfe dieser Studien sollte geklärt werden, ob eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer reduzierten A β -Peptidmenge führt.

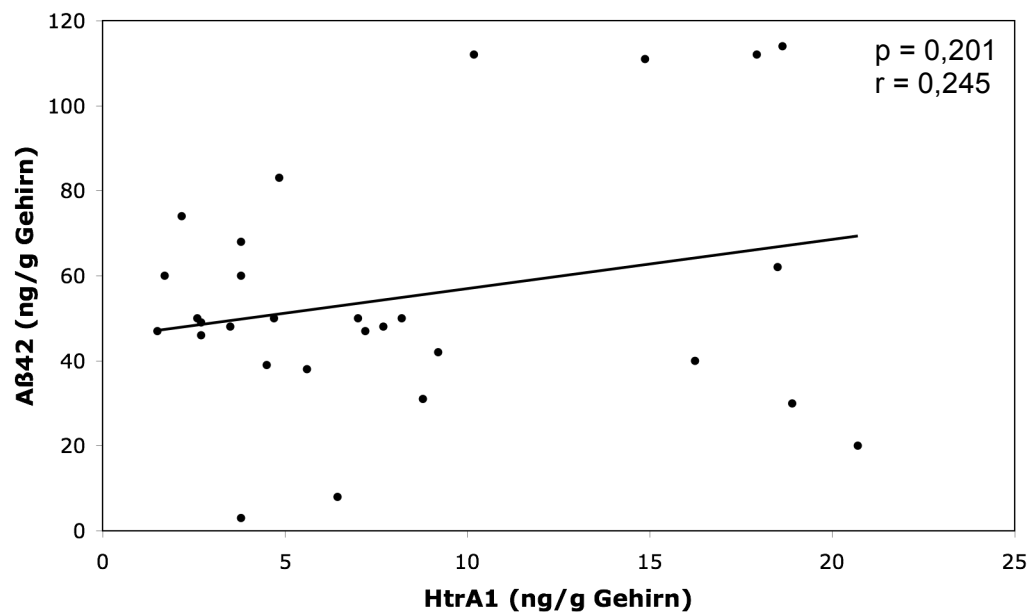
3.3.1 Korrelation zwischen der HtrA1-Proteinmenge und der A β_{42} -Peptidmenge in humanen Gehirngewebe

Für die humane Korrelationsstudie wurden die gleichen Gehirngewebe analysiert, welche bereits in vorherigen Studien untersucht wurden (3.1.7). Hierfür wurde mittels eines spezifischen ELISAs die A β_{42} -Peptidmenge bestimmt (2.3.15) und gegen die bereits zuvor ermittelte HtrA1-Proteinmenge graphisch aufgetragen. Anschließend wurde der Korrelationskoeffizient mit Hilfe des Auswertungsprogramms „GraphPad Prism5“ ermittelt.

Die Auswertung der Korrelationsstudie zeigte, dass bei den AD Patienten kein signifikanter p-Wert ($p = 0,201$) und ein positiver Pearson r-Wert ($r = 0,245$) bestimmt werden konnte (Abb. 3. 35 A). Die Auswertung der Kontrollen ergab ebenfalls keinen signifikanten p-Wert ($p = 0,328$), aber einen negativen Pearson r-Wert ($r = -0,209$) (Abb.3. 35 B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass in Gehirngewebe von AD Patienten eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge nicht mit einer reduzierten A β_{42} -Peptidmenge korreliert. Im Gegensatz dazu korreliert bei den Kontrollen eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge mit einer reduzierten A β_{42} -Peptidmenge. Diese Werte sind jedoch statistisch nicht signifikant.

(A)



(B)

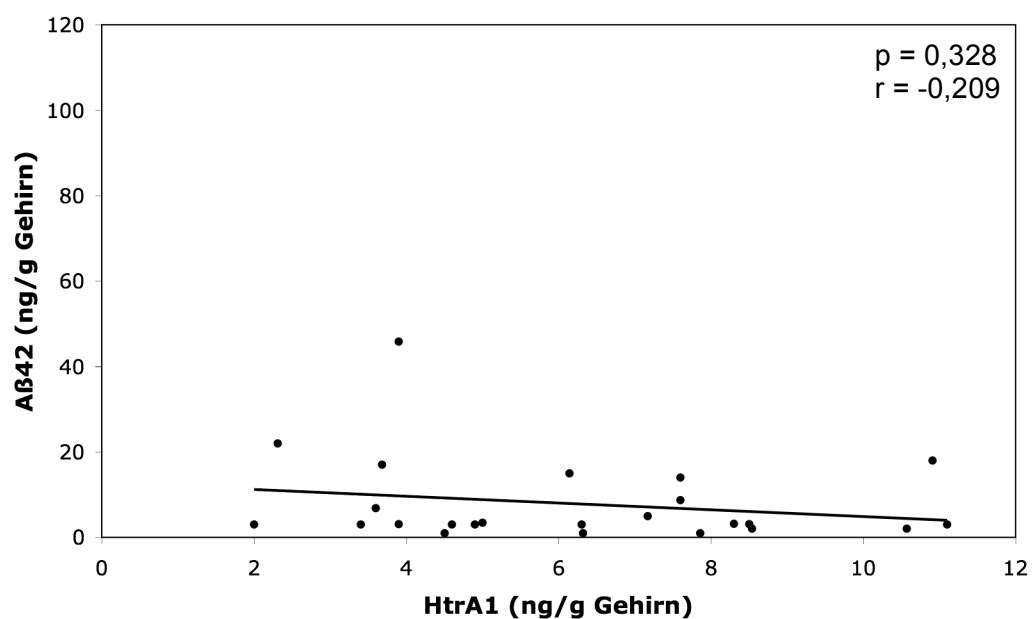


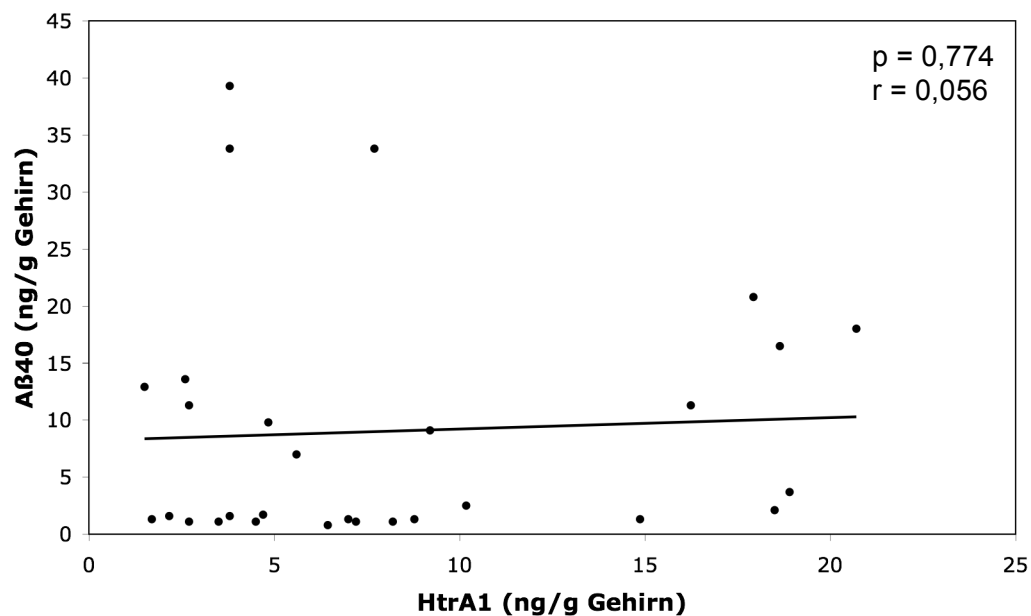
Abb. 3. 35 Korrelationsstudie der HtrA1- und Aβ₄₂-Peptidmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Die HtrA1-Proteinmenge und die Aβ₄₂-Peptidmenge wurde quantitativ im frontalen Kortex von Patienten mittels spezifischen ELISAs bestimmt. Untersucht wurden 29 AD Patienten (A) und 24 Kontrollen (B). Die HtrA1-Proteinmenge und Aβ₄₂-Peptidmengen wurden graphisch gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten wurde der p-Wert (p) und der Pearson r-Wert (r) ermittelt.

3.3.2 Korrelation zwischen der HtrA1-Proteinmenge und der A β ₄₀-Peptidmenge in humanen Gehirngewebe

Die A β -Ablagerungen bestehen aus der Zusammenlagerung des A β ₄₂- und A β ₄₀-Peptids, wobei es sich beim A β ₄₂-Peptid um die toxische Variante handelt, welche für die Stabilität der Ablagerung entscheidend ist (Paivio *et al.*, 2004). Im vorherigen Experiment konnte die funktionelle Relevanz der HtrA1 Protease für die Reduzierung des A β ₄₂-Peptids in Gehirngewebe nicht gezeigt werden (3.3.1). Zur Klärung, ob die Protease in der Lage ist die Anreicherung des weniger stabilen A β ₄₀-Peptids zu reduzieren wurden Korrelationsstudien durchgeführt. Hierfür wurden bei AD Patienten und Kontrollen die HtrA1-Proteinmenge und die A β ₄₀-Peptidmenge quantitativ mittels ELISA analysiert (2.3.15), die Proteinmengen wurden graphisch gegeneinander aufgetragen und der Korrelationskoeffizient wurde berechnet.

(A)



(B)

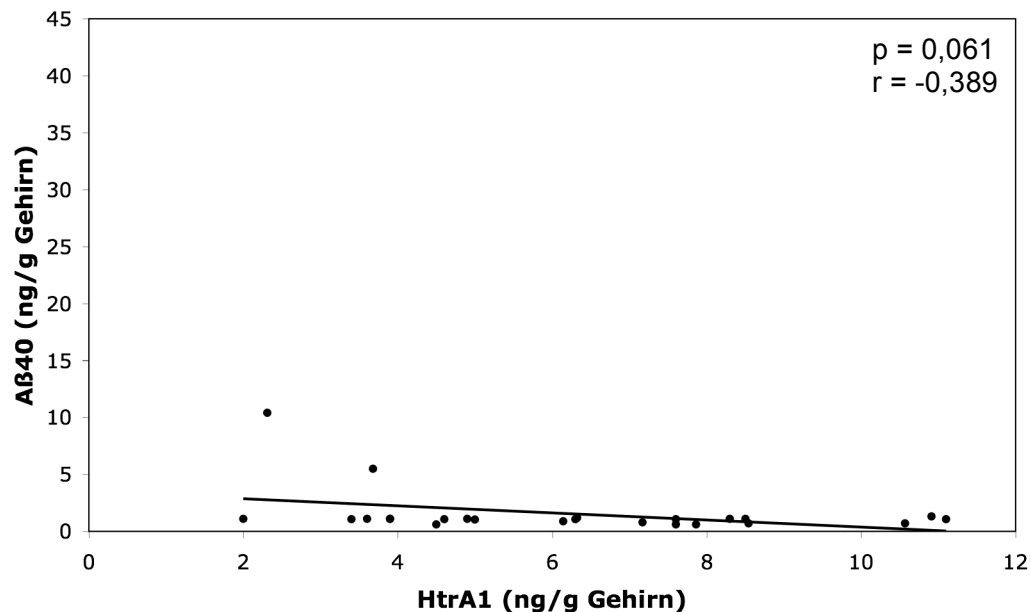


Abb. 3. 36 Korrelationsstudie der HtrA1- und Aβ₄₀-Peptidmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen

Die HtrA1-Proteinmenge und Aβ₄₀-Peptidmenge wurde mittels spezifischen ELISAs ermittelt. Untersucht wurden 29 AD Patienten (A) und 24 Kontrollen (B). Anschließend wurden die Proteinmengen gegeneinander aufgetragen und mit der Software „GraphPad Prism5“ wurde der Korrelationskoeffizient berechnet (p-Wert (p) und Pearson r-Wert (r)).

Das Ergebnis der Korrelationsstudie zeigte, dass bei den AD Patienten kein signifikanter p-Wert ($p = 0,774$) und ein positiver Pearson r-Wert ($r = 0,056$) bestimmt werden konnte. Somit hatte eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge keinen reduzierenden Effekt auf die Anreicherung der Aβ₄₀-Peptidmenge in Gehirngewebe (Abb. 3. 36 A). Im Gegensatz dazu korrelierte bei den Kontrollen eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge mit der Reduktion der Aβ₄₀-Peptidmenge. Dieses Ergebnis konnte aufgrund eines negativen Pearson r-Wert ($r = -0,389$) bestimmt werden. Da jedoch kein signifikanter p-Wert ($p = 0,061$) ermittelt wurde sind die Daten nicht signifikant (Abb. 3. 36 B).

Zusammenfassend führte eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge nicht zu einer signifikanten Reduktion der Aβ₄₂- und Aβ₄₀-Peptidmenge in Gehirngewebe von AD Patienten und Kontrollen.

3.3.3 Effekt eines HtrA1 *knockouts* in tg2576 Mäusen

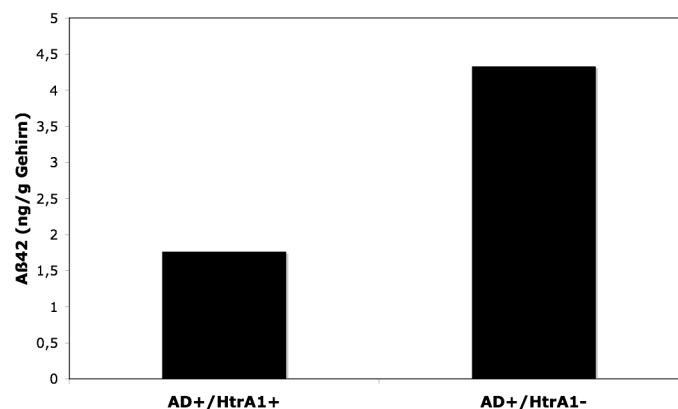
Bei der Untersuchung von Grundlagen und Ursachen bzw. Behandlungsmöglichkeiten von AD werden Mausmodelle genutzt, wie zum Beispiel das tg2576 Mausmodell. Die tg2576 Mäuse exprimieren die schwedische Doppelmutante des APP (K670 und M671L) (Hsiao *et al.*, 1996). Im Gehirn dieser Mäuse liegt die humane APP Mutante um das 5,5-fache höher vor als das native APP. Erinnerungsbeeinträchtigungen treten nach 6 Monaten auf, bevor es zu den ersten Protein-Ablagerungen kommt. In diesem Zeitraum treten ebenfalls erhöhte Mengen an löslichen A β Monomeren und löslichen A β Oligomeren auf (Westerman *et al.*, 2002). Nach 12 Monaten sind erste Plaque-Ablagerungen in mehreren kortikalen Regionen (frontal, temporal und entorhinal), Hippocampus, Subiculum und dem Cerebellum zu erkennen.

Um die Bedeutung der HtrA1 Protease für den Organismus zu analysieren, wurde in früheren Arbeiten eine HtrA1 *knockout* Maus generiert. Bei diesen Mäusen wurde gezielt das *HTRA1*-Gen ausgeschaltet. Ein Phänotyp konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

Um die funktionellen Relevanz der HtrA1 Protease beim Abbau des A β -Peptids zu untersuchen, wurden die tg2576 Mäuse mit den HtrA1 *knockout* Mäusen gekreuzt. Die Nachkommen wurden in AD⁺ und AD⁻ eingeteilt. Für die weiteren Studien wurden lediglich die AD⁺ Mäuse verwendet, da nur diese Mäuse die APP Mutante überexprimierten. Anschließend wurde bei den AD⁺ Mäusen die HtrA1-Expression mittels qRT-PCR analysiert und die Mäuse wurden in HtrA1⁺ und HtrA1⁻ eingeteilt (Daten nicht gezeigt). Um den Effekt einer reduzierten HtrA1-Expression auf die Anreicherung des A β -Peptids zu untersuchen, wurden aus dem Gehirngewebe von 14 AD⁺/HtrA1⁺- und 10 AD⁺/HtrA1⁻-Mäusen¹ die Proteine extrahiert (2.3.13) und mit Hilfe eines spezifischen A β ₄₂- bzw. A β ₄₀-ELISA wurde die Peptidmenge quantitativ bestimmt (2.3.15).

¹ freundlicherweise von Prof. Good, University School of Biosciences, Cardiff University, zur Verfügung gestellt

(A)



(B)

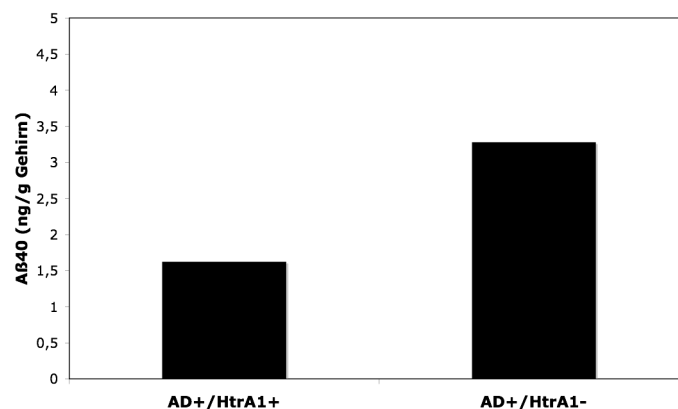


Abb. 3. 37 Quantitativer Nachweis der Aβ₄₂- und Aβ₄₀-Peptidmenge in Gehirngewebe von AD⁺/HtrA1⁺ und AD⁺/HtrA1⁻ Mäusen

Die Aβ₄₂- (A) und die Aβ₄₀-Peptidmenge (B) wurde quantitativ mittels spezifischem ELISA ermittelt. Dazu wurden 100 mg Gehirngewebe isoliert und die Proteine wurden mittels Ameisensäurebehandlung extrahiert. Untersucht wurden 14 AD⁺/HtrA1⁺ Mäuse und 10 AD⁺/HtrA1⁻ Mäuse. Eine Standardabweichung ist nicht dargestellt, da die Proben innerhalb einer Gruppe aufgrund des Altersunterschiedes stark schwankten.

Das Ergebnis der quantitativen Analyse der Aβ-Peptidmenge ist in Abb. 3. 37 dargestellt. Interessanterweise konnte in Gehirngewebe der AD⁺/HtrA1⁻-Mäuse, im Vergleich zu den AD⁺/HtrA1⁺-Mäusen, eine Anreicherung des Aβ₄₂-Peptids um den Faktor 2,8 bzw. eine Anreicherung des Aβ₄₀-Peptids um den Faktor 2,3 ermittelt werden. Die Anreicherung des Aβ-Peptids ist auf den *knockout* von HtrA1 zurückzuführen und unterstützt die in dieser Arbeitsgruppe erlangten *in vitro* Ergebnisse, dass HtrA1 das APP und seine Fragmente effizient abbauen kann (Grau *et al.*, 2005).

Eine Standardabweichung ist in der Graphik, aufgrund der Schwankungen der Aβ-Peptidmenge innerhalb einer Gruppe, nicht dargestellt. Dieses Ergebnis war jedoch zu erwarten, da die untersuchten Mäuse ein Alter zwischen 4-13 Monaten hatten und eine Anreicherung des Aβ-Peptids im Laufe des Alters bereits nachgewiesen wurde.

3.3.4 Anreicherung der A β -Peptidmenge in tg2576 x HtrA1 *knockout* Mäusen und in tg2576 Mäusen

Um die Anreicherung des A β -Peptids in den AD⁺/HtrA1⁻-Mäusen und AD⁺/HtrA1⁺-Mäusen zeitabhängig zu untersuchen, wurden die Mäuse entsprechend ihres Alter in Gruppen eingeteilt. Die Anzahl der Individuen innerhalb einer Gruppe schwankte jedoch zwischen einem bis fünf Individuen.

(A)



(B)

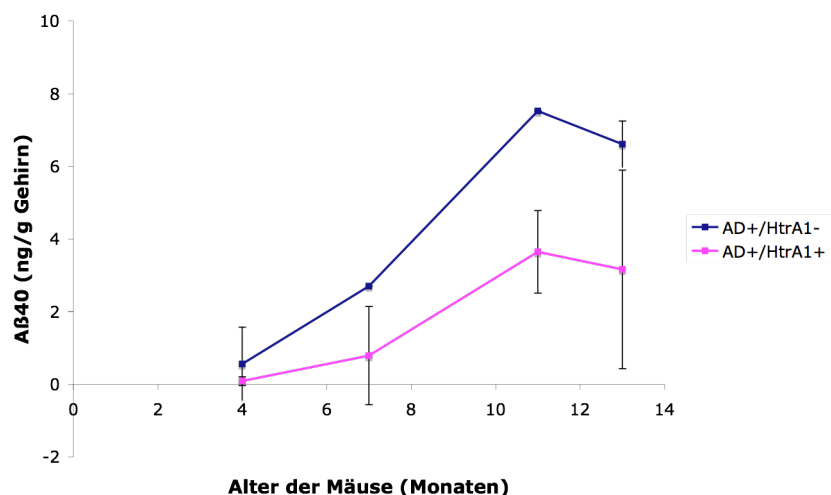


Abb. 3. 38 Altersbedingte Anreicherung der A β ₄₂- und A β ₄₀-Peptide in Gehirngewebe von AD⁺/HtrA1⁻ und AD⁺/HtrA1⁺ Mäusen

Die 10 AD⁺/HtrA1⁻-Mäuse und 14 AD⁺/HtrA1⁺-Mäuse wurden entsprechend ihres Alters in vier Gruppen eingeteilt und die A β ₄₂- (A) und A β ₄₀-Peptidmenge (B) wurde bestimmt. Anzahl der Individuen innerhalb einer Gruppe der AD⁺/HtrA1⁻-Mäuse: 4 Monate = 5 Mäuse, 7 Monate = 1 Maus, 11 Monate = 1 Maus, 13 Monate = 3 Mäuse. Anzahl der Individuen innerhalb einer Gruppe der AD⁺/HtrA1⁺-Mäuse: 4 Monate = 4 Mäuse, 7 Monate = 3 Mäuse, 11 Monate = 2 Mäuse, 13 Monate = 4 Mäuse. Die Standardabweichung wurde berechnet und in der Graphik dargestellt.

Die ermittelten *in vivo* Daten zeigen, dass in Gehirngewebe von tg2576 Mäuse der *knockout* von HtrA1 mit einer erhöhten Anreicherung des A β ₄₂-Peptids bzw. des A β ₄₀-Peptids einherging. Bei den 4 Monate alten AD⁺/HtrA1⁻-Mäusen konnte bereits ein Anstieg der A β -Peptidmenge analysiert werden, wohingegen bei den gleichaltrigen AD⁺/HtrA1⁺-Mäusen nur ein basaler A β -Level bestimmt werden konnte. Des weiteren konnte beobachtet werden, dass bei den älteren Mäusen die Expression von HtrA1 eine verzögerte Ansammlung des A β -Peptids zur Folge hatte (Abb. 3. 38).

Diese *in vivo* Daten lieferten weitere Hinweise, dass es sich bei HtrA1 um eine wirksame A β Protease handelt und die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Protease eine bedeutende Komponente der Protein-Qualitätskontrolle bei AD ist.

4. Diskussion

Die Alzheimersche Krankheit (AD) ist die häufigste Form der Demenz. AD wird durch den Verlust von Neuronen in spezifischen Gehirnarealen verursacht. Die etablierten Kennzeichen der Pathophysiologie des "Nervenzelluntergangs" sind amyloide Ablagerungen des A β -Peptids in Form von extrazellulären senilen Plaques und die Ablagerungen des hyperphosphorylierten tau-Proteins, welche sich zu intrazellulären neurofibrillären Bündel zusammenlagern.

AD ist bis heute nicht heilbar. Die Etablierung von effizienten Therapiestrategien ist notwendig, um die Prognose der Erkrankten zu verbessern. Ein möglicher Therapieansatz ist der Abbau der Ablagerungen durch Proteasen. Eine gezielte Erhöhung der proteolytischen Aktivität einer geeigneten Protease könnte als Strategie für neue Verfahren verwendet werden.

HtrA1 könnte in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Protease sein. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass HtrA1 das A β -Peptid effizient abbauen kann (Grau *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HtrA1 eine wirksame Protease zum Abbau von nativem und aggregiertem tau ist und dass humane Gehirnprouben mit erhöhten HtrA1 Mengen signifikant geringere Mengen an hyperphosphoryliertem tau aufweisen.

4.1 HtrA1 ist eine tau Protease

Zur Klärung, ob das tau-Protein ein Substrat von HtrA1 ist, wurden die Proteine gereinigt und die proteolytische Aktivität von HtrA1 wurde bestimmt. Neben dem nativen tau-Protein (wt-tau) wurde eine pseudohyperphosphorylierte Variante des Proteins (PHP-tau) als Substrat getestet. Bei dieser Variante wurden 10 Serin/Threonin-Reste gegen Glutamat ausgetauscht, um eine Phosphorylierung des Proteins nachzuahmen. Als Kontrolle wurde eine weitere Variante als Substrat getestet, bei der die gleichen As gegen Alanin ausgetauscht wurden (Ala-tau).

Das Ergebnis des Verdaus zeigte deutlich, dass HtrA1 alle drei tau-Varianten nach kurzer Zeit effizient abbauen konnte. Bei dem wt-tau- und dem Ala-tau-Protein wurden auch kleine Fragmente effizient abgebaut. Lediglich beim Verdau des PHP-tau-Proteins wurde

ein 20 kDa Fragment nachgewiesen, welches selbst bei einer längeren Inkubationszeit nicht vollständig abgebaut wurde. Die Entstehung des 20 kDa Fragments wirft die Frage auf, ob das Fragment die Tubulin-Bindende-Region mit den *Repeats* und der *Self-Assembly-Region* des tau-Proteins enthält, die Regionen die maßgeblich für die Aggregation des Proteins verantwortlich sind (von Bergen *et al.*, 2000; Mandelkow *et al.*, 2007).

Um diese Fragestellung zu klären wurden die tau-Fragmente mittels Maldi-TOF analysiert. Aus den gewonnenen Ergebnissen wurde deutlich, dass sich das 20 kDa Fragment innerhalb des N-Terminus befand und demzufolge nicht die *Repeats* und die *Self-Assembly-Region* enthielt, welche sich am C-Terminus des Proteins befinden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus eine inhibitorische Wirkung auf die Zusammenlagerung des Proteins ausübt und somit der Aggregation des Proteins entgegenwirkt (Carmel *et al.*, 1996).

Die *Self-Assembly-Region* mit der Sequenz $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ ist für die Ausbildung von *cross-β* Struktur und die anschließende Zusammenlagerung zu höheren Strukturen von entscheidender Bedeutung (von Bergen *et al.*, 2000). Die Analyse des Schnittmusters innerhalb der *Self-Assembly-Region* zeigte, dass HtrA1 bis zu 4-mal in dem Hexapeptid schneiden konnte, was zu einem vollständigen Abbau des Peptids führte.

Neben dem Hexapeptid sind die *Repeats* für die Zusammenlagerung zu höheren Strukturen entscheidend (Novak *et al.*, 1993). Die Auswertung des Schnittmusters in dieser Sequenz zeigte, dass die *Repeats* ebenfalls mit einer erhöhten Häufigkeit von HtrA1 geschnitten wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HtrA1 eine wirksame tau Protease ist, welche die für die Aggregation entscheidenden Bereiche effizient abbauen kann.

Um die Bedeutung der HtrA1 Protease beim Abbau des tau-Proteins weiter zu analysieren, wurden die Produktsequenzen ausgewertet. Die Auswertung ergab, dass alle drei tau-Varianten mit einem ähnlichen Schnittmuster von HtrA1 abgebaut wurden. Es entstanden Fragmente die zwischen 8 und 38 As lang waren, am häufigsten wurden Fragmente mit der Größe zwischen 9 und 22 As-Resten bestimmt. An der P1 Stelle konnte eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für kleine hydrophobe As, wie Valin, Alanin und Isoleucin bestimmt werden.

Interessanterweise konnte ein ähnliches Schnittmuster beim Komplettverdau der Citrat-Synthase und Malatdehydrogenase durch die bakterielle HtrA Protease DegP identifiziert werden. Hierbei ergaben sich Proteolyseprodukte zwischen 6 und 20 As. Diese definierten

Fragmentgrößen lassen darauf schließen, dass die Proteolyse in jeweils klar definierten Abständen stattfand. Die Auswertung der Produktsequenz ergab ebenfalls eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für kleine hydrophobe As an der P1 Stelle (Kolmar *et al.*, 1996; Krojer *et al.*, 2008).

Neben der Hyperphosphorylierung zählt die Aggregation des tau-Proteins zu den Hauptmerkmalen bei AD (von Bergen *et al.*, 2005). Um die Hypothese zu belegen, dass HtrA1 eine wirksame tau Protease ist, musste deshalb gezeigt werden, dass die Protease nicht nur in der Lage ist natives und pseudohyperphosphoryliertes tau-Protein abzubauen, sondern ebenfalls die entsprechenden tau-Aggregate. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden tau-Aggregate mit Hilfe des Cross-Linkers Formaldehyd hergestellt. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe von Formaldehyd große Aggregate des Proteins entstehen, die in ihrer Größe und Struktur große Ähnlichkeit mit den Ablagerungen des tau-Proteins in Gehirngewebe von AD Patienten aufweisen (Nie *et al.*, 2007a; Nie *et al.*, 2007b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass HtrA1 in der Lage ist tau Monomere, Dimere und Oligomere komplett abzubauen. Bemerkenswert ist dabei, dass Oligomere von wt-, Ala- und PHP-tau die größer als 1 MDa waren, komplett von HtrA1 proteolysiert wurden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die durch HtrA1 entstehenden tau-Fragmente eine Tendenz zur Aggregation aufweisen wurden die tau-Fragmente mit dem Cross-Linker Formaldehyd behandelt. Trotz der Zugabe von Formaldehyd konnte keine tau-Aggregation nachgewiesen werden. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass es sich bei HtrA1 um eine Protease handelt, die in der Lage ist tau-Aggregate abzubauen und dass die entstehenden Fragmente ihre Fähigkeit zur Aggregation verloren haben.

Die tau-Aggregate lagern sich in Neuronen zu hochmolekularen Strukturen zusammen, den PHFs. Die PHFs sind proteaseresistent und toxisch für die Zelle (Novak *et al.*, 1993; Buee *et al.*, 2000). Interessanterweise korreliert die Anreicherung der PHFs, im Vergleich zu den A β -Ablagerungen stärker mit den ersten neurobiologischen Veränderungen in Gehirngewebe von AD Patienten. So wurden im Hippocampus von AD Patienten, welche besonders durch progressive Neurodegeneration betroffen waren, tau-Ablagerungen nachgewiesen, jedoch keine A β -Ablagerungen (Prasher *et al.*, 1998). Des weiteren haben verschiedene Studien mit transgenen Mäusen gezeigt, dass der geistige Abbau dieser Mäuse besonders stark von der tau-Proteinmenge abhängt. Wird die Expression von tau

jedoch gehemmt, konnten sich die "Alzheimer-Mäuse" von den Symptomen wieder erholen. Auch andere Tierexperimente weisen darauf hin, dass erst durch die Anreicherung von tau-Ablagerungen die Demenzsymptome deutlich fortschreiten (Gotz, 2001; Gotz *et al.*, 2004).

Für die Therapie von AD wäre es daher essentiell, dass die PHFs abgebaut werden. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu analysieren, ob HtrA1 in der Lage ist PHFs, gereinigt aus Gehirngewebe von AD Patienten, abzubauen. Das Ergebnis des Verdaus zeigte deutlich, dass HtrA1 PHFs fast vollständig abbauen kann. Die Tatsache, dass HtrA1 sogar hocholigomere hyperphosphorylierte tau-Aggregate, die größer als 1 MDa waren, abbauen kann, unterstützt wesentlich die Hypothese, dass es sich bei HtrA1 um eine wirksame tau Protease handelt.

Bemerkenswerterweise konnte in der Literatur bisher keine Protease beschrieben werden, welche die Fähigkeit der HtrA1 Protease vereinigt. So kann die *Puromycin-Sensitive Aminopeptidase* (PSA) zwar monomeres nicht-pathogenes tau-Protein abbauen, zeigt aber nur eine schwache Aktivität gegenüber löslichen tau-Proteinen oder PHFs, gereinigt aus dem Gehirngewebe von AD Patienten (Sengupta *et al.*, 2006). Der Verdaus von tau durch Caspase führt zu der Entstehung von tau-Fragmenten, welche eine höhere Tendenz zur Aggregation aufweisen als das native tau-Protein (Gamblin *et al.*, 2003b; Rissman *et al.*, 2004). Die tau-Fragmente, die durch die Prozessierung von Cathepsin D oder Thrombin entstehen, weisen eine intakte Tubulin-Bindende-Region auf und demzufolge ein erhöhtes Potential zur Aggregation (Olesen, 1994; Kenessey *et al.*, 1997). Calpain schneidet das monomere tau-Protein hoch spezifisch. Diese Protease zeigt jedoch eine geringe proteolytische Aktivität gegenüber hyperphosphorylierten und aggregierten tau-Proteinen (Mercken *et al.*, 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass HtrA1 eine wirksame tau Protease ist, welche die Fähigkeit vereinigt die Tubulin bindenden *Repeats*, die *Self-Assembly-Region*, tau-Aggregate und PHFs abzubauen. Dabei ist die Protease in der Lage so zu schneiden, dass die entstehenden Fragmente ihre Fähigkeit zur Aggregation verlieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung bzw. die Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins die enzymatische Aktivität der Protease nicht beeinträchtigt.

4.2 Synthetische Substrate und Inhibitoren für HtrA1

Mit Hilfe eines in dieser Arbeit etablierten Enzymtests wurden zwei tau-pNAs (tau4- und tau5-pNA) identifiziert, die von HtrA1 proteolysiert wurden. Interessanterweise beinhaltet die Sequenz des tau-4 Substrats den C-Terminus der *Self-Assembly-Region* und die des tau-5 Substrats den C-Terminus des *Repeats 4*.

In der Literatur wurden tau Proteasen beschrieben durch deren Aktivität tau-Fragmente entstehen, die ein höheres Potential zu Aggregation aufweisen als die native Form (Novak *et al.*, 1993; Gamblin *et al.*, 2003; Rissman *et al.*, 2004). Da HtrA1 in der Lage ist kleine tau-Peptide zu schneiden, kann vermuten werden, dass die Protease tau-Fragmente abbauen kann, die durch andere Proteasen entstanden sind und damit die Aggregation dieser Fragmente verhindern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere pNA-Substrate identifiziert, die von HtrA1 mit einer hohen spezifischen Aktivität umgesetzt wurden. Die Sequenz des einen pNA-Substrats leitete sich von der Insulin β -Kette ab (Hou *et al.*, 2005) während sich die andere Sequenz von dem bakteriellen RseA ableitet. Ursprünglich wurde das RseA-pNA als Substrat von DegS, einem weiteren bakteriellen Mitglied der HtrA-Familie, identifiziert (Alba *et al.*, 2002). Da HtrA1 dieses Substrat mit einer hohen Spezifität umsetzt kann vermutet werden, dass anhand der gut charakterisierten bakteriellen Mitglieder der HtrA-Familie Informationen über HtrA1 gewonnen werden können.

Im nächsten Schritt sollten Substanzen auf ihre inhibitorische oder aktivatorische Wirkung bezüglich der Aktivität der HtrA1 Protease, mit Hilfe des quantifizierbaren Enzymtests, analysiert werden. Hierbei konnte ein Boronsäurederivat gefunden werden, welches die enzymatische Aktivität von HtrA1 vollständig inhibierte. In früheren Arbeiten wurde das Peptid des Inhibitors, mit der Sequenz DPMFKGV, durch den Komplettverdau der Citrat-Synthase und Malatdehydrogenase durch das bakterielle Homolog DegP identifiziert (Krojer *et al.*, 2008). Das DPMFKGV-Boronsäurederivat zeigte bei DegP ebenfalls eine starke inhibitorische Wirkung (siehe Doktorarbeit Michael Meltzer). Das Ergebnis der Inhibierung von HtrA1 zieht die Frage zur Wirkungsweise der Interaktion des Inhibitors mit HtrA1 auf struktureller Ebene nach sich. Zur Aufklärung dieser Fragestellung, wurde in Kooperation mit Dr. Clausen am IMP in Wien, die Kristallstruktur von HtrA1 mit dem DPMFKGV-Boronsäurederivat analysiert. Die erhaltene Kristallstruktur kann Aufschluss

über die an der Proteolyse beteiligten As geben. Zusätzlich kann die Kristallstruktur helfen einen Aktivator für HtrA1 zu konstruieren.

Für einige HtrA-Familienmitglieder wurden bereits Kristallstrukturen bestimmt. Bei DegP konnte mit Hilfe der Kristallstruktur gezeigt werden, dass DegP im 24meren Oligomerisierungszustand vorkommt und dass sich das Dodecamer aus zwei gestapelten Hexameren bildet, welche wiederum aus zwei Trimeren bestehen. Interessanterweise konnte die Bestimmung des 24mers nur bei gleichzeitiger Bindung von fehlgefalteten Proteinen, in diesem Fall von Außenmembranproteinen (Omps), erfolgen (Krojer *et al.*, 2008). Außerdem konnte die Kristallstruktur des bakteriellen DegS (Wilken *et al.*, 2004; Hasselblatt *et al.*, 2007), des humanen HtrA2 (Li *et al.*, 2002a) und die Protease Domäne eines HtrA Hitzeschockproteins aus *Thermotoga maritima* (Kim *et al.*, 2003) analysiert werden. Die Kristallstrukturen der bislang untersuchten HtrA-Mitglieder zeigten eine trimere Grundstruktur, welche durch die Wechselwirkungen von Protease und PDZ Domäne stabilisiert wurden. Die Auflösung der HtrA1 Kristallstruktur kann demzufolge auch Hinweise über den oligomeren Zustand des Proteins liefern.

4.3 HtrA1 ist eine intrazelluläre tau Protease

Die ermittelten biochemischen Daten haben HtrA1 *in vitro* als geeignete tau Protease charakterisiert. Zur weiteren Untersuchung der proteolytischen Aktivität von HtrA1 wurden Zellkulturexperimente durchgeführt. Hierfür wurde mittels viralen Gentransfers die HtrA1 Konzentration in PC12 Zelllinien spezifisch herunterreguliert oder überproduziert. Für den Gentransfer wurden PC12 Zelllinien verwendet, die bereits das humane wt-, PHP-tau oder den Leervektor überproduzierten. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PHP-tau einen toxischen Effekt auf PC12 Zellen hat. So konnte in diesen Zellen Chromatinkondensation, DNA Fragmentierung und Caspase-3 Aktivierung beobachtet werden. Eine Aggregation des PHP-tau-Proteins wurde allerdings nicht festgestellt (Fath *et al.*, 2002). Zusätzlich konnte in dem Organismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gezeigt werden, dass eine Überproduktion des PHP-tau-Proteins zu einer Beeinträchtigung der Motoneuronen führt. Dieses Ergebnis könnte mit einer funktionellen Störung der Entwicklung der Motoneuronen, bedingt durch die stabile Überexpression des PHP-tau-Proteins, erklärt werden (Brandt *et al.*, 2009).

Um zu untersuchen, ob die Depletion der HtrA1-RNA-Expression einen Effekt auf die wt- und PHP-tau Proteinmenge hat, wurde mittels Transduktion ein shHtrA1rat-Konstrukt in die PC12 Zelllinien eingebracht. Es konnten keine Zellen kultiviert werden, bei denen die HtrA1-Expression effizient inhibiert wurde. Da die Zellen, welche mit dem Leervektor transduziert wurden überlebensfähig waren, kann man einen Zusammenhang zwischen der HtrA1 Inhibierung und dem Absterben der Zellen ziehen. Um diese These zu belegen, müsste jedoch mit Hilfe eines induzierbaren Systems die HtrA1-RNA-Expression herunterreguliert werden.

Um den Effekt einer HtrA1-Expressionssteigerung auf die tau-Proteinmenge zu analysieren, wurde mittels viralen Gentransfers humanes HtrA1 stabil in die PC12 Zelllinien eingebracht. Auf Proteinebene konnte ein deutlicher Anstieg der HtrA1-Proteinmenge detektiert werden. Als Kontrolle wurden die Zelllinien mit dem Leervektor transduziert. In den Zelllinien wurde die Proteinmengen von HtrA1, tau und Aktin nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin diene als Ladekontrolle. Das Ergebnis zeigte, dass die Zellen die HtrA1 überproduzierten, im Vergleich zu den Zellen die mit dem Leervektor transduziert waren, eine deutlich reduzierte tau-Proteinmenge aufwiesen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität der HtrA1 Protease hatte.

4.4 Tau induzierte eine bisher unbekannte Stressantwort

Einige Mitglieder der HtrA-Familie sind an verschiedenen Stressantworten der Zelle beteiligt. So ist DegP als Hitzeschockprotein ein wichtiger Faktor bei der Stressantwort von *E. coli*. Interessanterweise besitzt DegP neben der proteolytischen Aktivität auch die Fähigkeit als Chaperon zu agieren. Der Wechsel von der Protease zum Chaperone ist dabei abhängig von der Temperatur (Spiess *et al.*, 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass die inaktive Mutante DegP_{S210A} die Aggregation von ungefalteten Substraten verhindern kann (Skorko-Glonek *et al.*, 2007). Diese Eigenschaften zeichnen DegP als eine bedeutende Komponente der Protein-Qualitätskontrolle aus (Clausen *et al.*, 2002).

Die Serinprotease DegS spielt ebenfalls in der Protein-Qualitätskontrolle in *E. coli* eine bedeutende Rolle. DegS ist inaktiv so lange die Protease nicht durch ein Stresssignal im Periplasma aktiviert wird. Die aktivierte Protease schneidet RseA. Dies löst eine

Signalkaskade aus, an deren Ende Stress-regulierte-Gene überexprimiert werden (Hasenbein *et al.*, 2007). Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass HtrA1 ebenfalls in der Lage ist, RseA-pNAs zu schneiden. Dies spricht für die hohe Konservierung der HtrA1 Protease im Laufe der Evolution.

Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass die humane HtrA2 Serinprotease ebenfalls bei zellulären Stressantworten involviert ist. So führt die Behandlung von Zellen mit Tunicamycin oder die Auswirkungen eines Hitzeschock zu einer erhöhten Expression von HtrA2 (Gray *et al.*, 2000). Bei HtrA1 führt eine Temperaturerhöhung nicht zu einer Expressionssteigerung. Dennoch scheinen andere Stresssignale eine erhöhte Expression von HtrA1 zu bewirken. Ein derartiger Effekt wurde bei Osteoarthritis (Hu *et al.*, 1998) und während der Alterung (Ly und Handelsman, 2002) nachgewiesen.

Die aufgelisteten Eigenschaften der HtrA-Mitglieder belegen, dass sie an wichtigen Prozessen der Protein-Qualitätskontrolle beteiligt sind. Dabei unterscheiden sich die Mitglieder von anderen gut untersuchten Serinproteasen in ihrer komplexen Struktur und der Regulation der katalytischen Aktivität. Im Gegensatz zu Trypsin, welches nach der Zymogeninduktion konstitutiv aktiv ist, können die HtrA Proteasen zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand reversibel umschalten. Dieses Umschalten wird durch Konformationsänderungen koordiniert und wird häufig durch die Anwesenheit von fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen ausgelöst (Clausen *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass die HtrA-Mitglieder ohne Kofaktoren wie ATP oder zweiwertigen Kationen aktiviert werden können, zeichnet sie zusätzlich als besondere Proteasen aus (Swamy *et al.*, 1983).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob HtrA1 ein Teil der Stressantwort ist, die durch erhöhte Mengen an tau-Proteinen ausgelöst wird. Es konnte gezeigt werden, dass in den PC12 Zelllinien die HtrA1-RNA-Expression bei den wt-tau überexprimierenden Zellen moderat (Faktor von 2,5) und bei den PHP-tau überexprimierenden Zellen signifikant erhöht war (Faktor von 6,8). Die HtrA1-RNA-Expression in PHP-tau Zellen war demzufolge mehr als doppelt so hoch wie in den wt-tau Zellen. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht nur die Erhöhung der tau-Proteinmenge, sondern auch die Phosphorylierung bzw. Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins für die Erhöhung der HtrA1-RNA-Expression verantwortlich ist. HtrA1 scheint somit ein Teil der Stressantwort zu sein, die durch hyperphosphorylierte tau-Proteine ausgelöst wird.

Zur weiteren Untersuchung der tau induzierten Stressantwort wurden erhöhte Mengen an tau-Protein in den Zellüberstand von U373-MG, HEK-293T und PC12 Zellen gegeben und die HtrA1-RNA-Expression wurde bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass selbst über eine längere Zeitspanne kein Anstieg der HtrA1-RNA-Expression in den Zelllinien detektiert werden konnte. Interessanterweise führte jedoch die Zugabe von tau in den Zellkulturüberstand zu einer deutlichen Erhöhung der HtrA1-Proteinmenge extrazellulär. Da dieses Ergebnis in allen untersuchten Zelllinien reproduziert werden konnte, kann vermutet werden, dass es sich bei der tau induzierten Stressantwort um eine generelle Stressantwort handelt.

Die Tatsache, dass HtrA1 sowohl auf Transkriptionsebene als auch Translationsebene reguliert werden kann, wirft die Frage auf, ob die Zellen mit einer unterschiedlichen Signalkaskade reagieren, je nachdem, ob die tau-Proteinmenge intrazellulär oder extrazellulär erhöht ist. Möglicherweise nutzt die Zelle unterschiedliche Mechanismen, um sich schnell vor toxischen extrazellulären tau-Aggregaten zu schützen oder langfristig der Anreicherung von intrazellulären tau-Proteinen entgegenzuwirken.

Kürzlich veröffentlichte Studien haben gezeigt, dass erhöhte Mengen an tau eine Signalkaskade induzieren, an deren Ende Hitzeschockproteine erhöht exprimiert werden (Gotz *et al.*, 2008; Dickey *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass HtrA1 ebenfalls ein Teil der tau induzierten Stressantwort ist und somit als Komponente der Protein-Qualitätskontrolle von AD angesehen werden kann.

4.5 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von HtrA1 und tau

Die Arbeit von Grau *et al.* hat gezeigt, dass HtrA1 zu 20% intrazellulär und zu 80% extrazellulär lokalisiert ist (Grau *et al.*, 2005). Weiterführende Arbeiten, mittels Western-Blot von Zelllysaten (Clawson *et al.*, 2008) und Immunogold-Elektronenmikroskopie (De Luca *et al.*, 2004) bestätigen das intrazelluläre Vorkommen von HtrA1. Keine dieser Untersuchungen konnte jedoch die genaue intrazelluläre Lokalisation von HtrA1 bestimmen.

Zur Klärung der subzellulären Lokalisation von HtrA1 wurden transiente Transfektionsexperimente mit U373MG-Zellen durchgeführt und am konfokalen Lasermikroskop ausgewertet. Die Untersuchung der HtrA1 transfizierten Zellen lies die

Vermutung zu, dass die Protease eine Lokalisation zu dem Mikrotubuli-Netzwerk aufwies. Diese Vermutung wurde von der Tatsache unterstützt, dass eine erhöhte Expression von HtrA1 zu einer Bündelung des Mikrotubuli-Netzwerkes führte, was sich in einer Verstärkung der Faserbündel äußerte. So konnte bei HtrA1 überexprimierenden Zellen, bedingt durch die Kondensation der Faserbündel, eine veränderte Zellmorphologie beobachtet werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit vorangegangenen Studien in denen gezeigt wurde, dass die Überexpression von anderen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen ebenfalls zu einer Bündelung des Mikrotubuli-Netzwerkes führt (Faller und Brown, 2009).

Mit Hilfe einer Überlagerung des HtrA1- und des Tubulin-Signals, in HtrA1 transfizierten und Tubulin gefärbten Zellen, konnte letztendlich der eindeutige Nachweis erbracht werden, dass HtrA1 eine Lokalisation zum Mikrotubuli-Netzwerk zeigt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch vorangegangene Studien in denen gezeigt wurde, dass HtrA1 in der Lage ist an Tubulin zu binden und abzubauen (Chien und Shridhar, 2009).

Das HtrA1-Protein ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut, deren Bedeutung für die intrazelluläre Lokalisation mit Hilfe verschiedener Konstrukte analysiert werden sollte. Die Ergebnisse zeigten, dass die mac25 Domäne für die Lokalisation nicht entscheidend war, da ein HtrA1-Konstrukt bestehend aus der Protease und PDZ Domäne ebenfalls Mikrotubuli lokalisiert vorkam.

Mit Hilfe von zwei weiteren HtrA1-Konstrukten sollte die Bedeutung der PDZ Domäne für die Lokalisation analysiert werden. Die klassische Funktion der PDZ Domäne ist die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkung durch spezifische Bindungen. Dabei erkennt sie den C-Terminus der Zielproteine und bindet an die drei bis vier letzten As (Harrison, 1996; Harris und Lim, 2001). Zur Klärung, ob eine weitere Funktion der PDZ Domäne die Lokalisation des HtrA1-Proteins ist, wurde die mac25 und die Protease Domäne in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Beim zweiten Konstrukt wurde lediglich die PDZ Domäne in den Expressionsvektor kloniert. Die Untersuchung der transfizierten Zellen zeigte, dass beide Konstrukte zytoplasmatisch lokalisiert waren. Möglicherweise konnte eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden, weil die PDZ Domäne sich nicht richtig gefaltet hat oder weil die PDZ Domäne Dimere gebildet hat, was eine Lokalisation verhinderte. Weiterhin könnte vermutet werden, dass nur durch die Interaktion aus PDZ und Protease Domäne eine richtige Lokalisation ermöglicht werden kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion von PDZ und Protease

Domäne erweiterte Funktionsmöglichkeiten zulässt (Keiler *et al.*, 1996; Beebe *et al.*, 2000). Abschließend kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die PDZ Domäne für die Lokalisation von HtrA1 entscheidend ist.

Das tau-Protein ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches hauptsächlich im ZNS exprimiert wird (Binder *et al.*, 1985). Wie bereits erwähnt, ist die funktionelle Relevanz von tau die Stabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes. Dabei interagiert tau mit Tubulin über drei oder vier *Repeats* an seinem C-Terminus (Alberts *et al.*, 1997). Um zu belegen, dass HtrA1 und tau in der Zelle die gleiche subzelluläre Lokalisation aufweisen wurden Kollokalisationsstudien der Proteine durchgeführt und ausgewertet. Die transienten Kotransfektionsexperimente von HtrA1 und tau zeigten, dass die Proteine eindeutig koloalisiert an Mikrotubuli vorkamen. Mittels einer Überlagerung der Signale konnte diese Kollokalisation verdeutlicht werden.

4.6 Die Auswirkungen einer erhöhten HtrA1-Proteinmenge auf die Anreicherung des tau-Proteins in Gehirngewebe

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die zytosolisch lokalisierten tau-Proteine in Gehirngewebe von AD Patienten aggregieren und diese Aggregate für den fortschreitenden Verlust von Neuronen in spezifischen Gehirnarealen verantwortlich sind (Kurz, 1997). Die progressive Neurodegeneration findet besonders in den Gehirnarealen des Kortex statt (Patil *et al.*, 2008).

Um die Wirksamkeit der HtrA1 Protease weiter zu analysieren wurde Gehirngewebe aus dem Kortex von AD Patienten und Kontrollen entfernt. Anschließend wurden in dieser Arbeit Techniken etabliert, um die Proteine aus den Aggregaten zu lösen und sie quantitativ zu bestimmen. Die quantifizierte HtrA1- und tau-Proteinmenge wurde danach mittels Korrelationsstudie ausgewertet. Das Ergebnis zeigte, dass bei AD Patienten eine eindeutige Korrelation zwischen den Proteinmengen vorlag. Patienten, die eine erhöhte Menge an HtrA1 aufwiesen, zeigten eine reduzierte Menge an tau und dies in einem statistisch signifikantem Verhältnis. Die vorliegenden Daten sind insofern von großer Bedeutung, da die tau-Ablagerungen und die damit verbundene neuronale Toxizität im Mittelpunkt der Krankheit stehen (Mukrasch *et al.*, 2005).

Interessanterweise konnte bei den Kontrollen keine statistisch signifikante Korrelation analysiert werden. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung darauf zurückführen, dass tau seine natürliche Funktion, nämlich die Stabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes, wahrnimmt und deshalb Mikrotubuli-assoziiert vorliegt (Weingarten *et al.*, 1975). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die *Repeats* des tau-Proteins Wechselwirkungen mit dem Tubulin eingehen und strukturiert vorliegen (Butner und Kirschner, 1991; Goode *et al.*, 2000).

Anhand dieser Ergebnisse kann folgendes Modell aufgestellt werden: HtrA1 ist nicht in der Lage tau-Proteine zu proteolysieren, wenn diese strukturiert am Mikrotubuli-Netzwerk vorkommen, kommt es jedoch im Laufe von AD zu löslichen und aggregierten tau-Proteinen im Zytosol stellt tau ein Substrat der HtrA1 Protease dar (Abb. 4. 1).

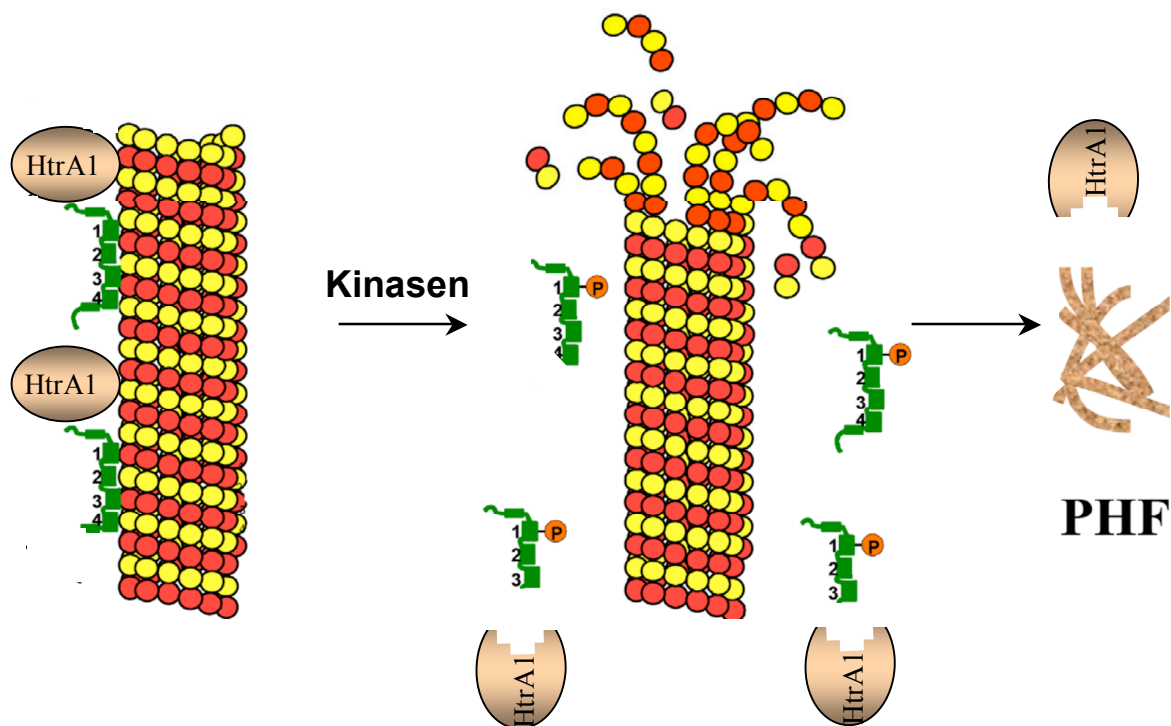


Abb. 4. 1 Modell des Abbaus von tau durch HtrA1

Das tau-Protein dient als Stabilisator des Mikrotubuli-Netzwerkes. Die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins durch Kinasen führt jedoch zur Ablösung und als Folge zur Destabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerkes. Anschließend kommt es im Zytosol zur Zusammenlagerung der hyperphosphorylierten tau-Proteine in Form von PHFs. Die HtrA1 Serinprotease scheint in der Lage zu sein, lösliches und aggregiertes tau-Protein abzubauen. Tau-Proteine welche gebunden am Mikrotubuli-Netzwerk vorliegen scheinen jedoch kein Substrat der Protease zu sein.

Eine andere Möglichkeit, warum bei AD Patienten eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer reduzierten Anreicherung des tau-Proteins führt, könnte eine Aktivierung der Protease bedingt durch die Erkrankung sein, z.B. über posttranslationale Modifikation.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass bei den AD Patienten im Vergleich zu den Kontrollen eine statistisch signifikant erhöhte HtrA1-RNA-Expression vorlag. Bei den AD Patienten konnte eine 2-fach erhöhte Expression von HtrA1 festgestellt werden. Die Regulation der Transkription des *HTRA1*-Gens ist ein weiterer Hinweis, dass HtrA1 ein Teil der Protein-Qualitätskontrolle bei AD ist.

Neben der Aggregation ist die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins eines der pathologischen Merkmale die man bei AD beobachten kann (Braak *et al.*, 1994). Tau-Proteine, die aus Gehirngeweben von AD Patienten isoliert wurden, weisen eine stöchiometrische Phosphorylierung von 6-8 mol Phosphat/mol tau auf. Bei Kontrollen findet man 1,9 mol Phosphat/mol tau (Kenessey und Yen, 1993).

Um zu klären ob die HtrA1-Proteinmenge auch mit der Proteinmenge von hyperphosphoryliertem tau in Gehirngeweben korreliert wurden weitere Tests durchgeführt. Hierfür wurde die Phosphorylierungsstelle-396 des tau-Proteins quantitativ bestimmt. Das tau-Protein wird an dieser Stelle von der Serin/Threonin Kinase GSK-3 β phosphoryliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierungsstelle sich als gute Nachweismethode von PHFs und von neurofibrillären Bündel eignet (Brandt *et al.*, 2009). Diese Feststellung konnte sowohl in transfizierten Zellen (Lovestone *et al.*, 1996) als auch *in vivo* (Hong *et al.*, 1997; Munoz-Montano *et al.*, 1997) nachgewiesen werden.

Interessanterweise kann mittels der GSK-3 β ein funktioneller Zusammenhang zwischen den A β -Ablagerungen und den tau-Ablagerungen bestimmt werden, da die GSK-3 β durch erhöhte Mengen von extrazellulären A β aktiviert wird (Takashima *et al.*, 1996). Die aktivierte Kinase phosphoryliert anschließend das Mikrotubuli-assoziierte tau-Protein an verschiedenen Stellen, unter anderem an der 396-Stelle, und führt damit zu einer Ablösung des tau-Proteins von den Mikrotubuli (Reynolds *et al.*, 2000).

Das Ergebnis der Korrelationsstudie zwischen der HtrA1- und tau-P396-Proteinmenge zeigte eindeutig eine statistisch signifikante Korrelation bei den AD Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer reduzierten tau-P396-Proteinmenge führte. Bei den Kontrollen wurde eine geringe Menge an phosphoryliertem tau bestimmt, was zu erwarten war, da die GSK-3 β Kinase nicht aktiv vorlag. Die nachweisbaren Mengen an tau-P396 korrelierten nicht mit dem HtrA1-Protein.

Unterstützt werden die Daten durch die Auszählung von neurofibrillären Bündel und neuritischen Plaques bei AD Patienten und Kontrollen. Das Ergebnis der Auszählung ergab ebenfalls eine statistisch relevante Korrelation zwischen der Menge an tau- bzw. A β -Ablagerungen und der HtrA1-Proteinmenge bei AD Patienten. Zeigten die Patienten hohe HtrA1-Proteinmengen waren die Protein-Ablagerungen reduziert. Dieses Ergebnis konnte bei den AD Patienten gezeigt werden, wohingegen bei den Kontrollen keine signifikante Korrelation festgestellt werden konnte (persönliche Mitteilung von Prof. Egensperger).

Zusammenfassend konnte HtrA1 als eine Protease charakterisiert werden, welche die Anreicherung von nativem und hyperphosphoryliertem tau in Gehirngewebe von AD Patienten reduziert. Damit wurde ein entscheidender Beweis über die Relevanz der HtrA1 Protease in der Protein-Qualitätskontrolle bei AD erbracht.

4.7 Die Rolle des *HTRA1* Promotor SNPs rs11200639 bei AD

Mit dem Alter steigt das Risiko an AD zu erkranken. Dennoch können auch genetische Faktoren das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Einige Studien haben sich mit dem genetischen Hintergrund der Krankheit befasst, um mögliche Risikofaktoren zu identifizieren (Pericak-Vance *et al.*, 1991; Strittmatter *et al.*, 1993; Kamboh *et al.*, 1995). Hierbei wurde unter anderem eine Linkage-Region auf Chromosom 10 (10q21-10q25) bestimmt, welche mit einem erhöhten Risiko an AD zu erkranken in Verbindung gebracht wurde (Bertram *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002b). Interessanterweise befindet sich in dieser Region das *HTRA1*-Gen.

Ein einzelner Nukleotid Polymorphismus (SNP; rs11200638) in der Promotorregion des *HTRA1*-Gens ist mit dem Risiko an altersbedingter Makuladegeneration (AMD) zu erkranken assoziiert. Bei der Analyse der funktionellen Relevanz des SNPs wurden zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in dieser Region binden können, der *Adaptor-Related Protein Complex 2 α* (AP2 α) und der *Serum Response Factor* (SRF). Die Bindungsfähigkeit der Transkriptionsfaktoren ist jedoch verändert wenn das A Risiko Allel anstelle des G-Allels auftritt. Mittels eines Luziferase-Assay konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der SNP (AA-Genotyp) eine tendenziell höhere Luziferase-Expression induziert als der nicht vorhanden SNP (GG-Genotyp) (Dewan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

Die Tatsache, dass die HtrA1-RNA-Expression aufgrund des Polymorphismus verändert wird, wirft die Frage auf, ob der Polymorphismus auch mit dem Risiko an AD zu erkranken in Verbindung gebracht werden kann. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Genotyp von AD Patienten und Kontrollen bestimmt. Das Ergebnis der Genotypisierung zeigte, dass die Häufigkeit mit der die unterschiedlichen Genotypen auftraten, sich bei den AD Patienten und den Kontrollen nicht signifikant unterschieden. Der GG-Genotyp wurde am häufigsten bestimmt und der GA-Genotyp am zweithäufigsten. Der AA-Genotyp konnte nur bei zwei AD Patienten und bei einer Kontrolle bestimmt werden. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse kann man vermuten, dass der Genotyp kein Risiko darstellt an AD zu erkranken. Im Rahmen vorangegangener Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass der SNP eine Modifikation des Erkrankungsbeginns zur Folge hat. Individuen mit dem AA- oder GA-Genotyp erkrankten im Durchschnitt 2,7 Jahre früher an AD als Träger des GG-Genotyps. Gestützt werden diese Daten durch die Tatsache, dass in Gehirngewebe von AD Patienten mit dem AA- oder GA-Genotyp die Anzahl der neuritischen Plaques und die neurofibrillären Bündel signifikant höher ist als bei Trägern des GG-Genotyps (siehe Doktorarbeit Anca Laura Tirniceriu).

Interessanterweise konnte auf Chromosom 10 ein weiteres Protein identifiziert werden, welches den Erkrankungsbeginn bei AD modifiziert, das *Plasminogen Activator Urokinase* (PLAU) Gen (Kamboh, 2004). Zwei Polymorphismen wurden beschrieben (rs 2227571 und rs4065), welche ein früheres Auftreten der Erkrankung (um 1 Jahr) bei sporadischen AD Patienten bewirkt (Ozturk *et al.*, 2007).

Ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen dem SNP und HtrA1 wurde aus den Ergebnissen der AMD Studie abgeleitet und war Ausgangspunkt für die Durchführung weiterer Experimente. Es konnte gezeigt werden, dass bei AMD Patienten mit dem AA-Genotyp die HtrA1-RNA-Expression um den Faktor 2,7 und die HtrA1-Proteinmenge um den Faktor 1,7 erhöht ist (Yang *et al.*, 2006). Um die Bedeutung des SNPs bei AD zu untersuchen wurden in einem ersten Schritt die HtrA1-RNA-Expression und die HtrA1-Proteinmengen bei AD Patienten und Kontrollen quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, dass bei den AD Patienten im Vergleich zu den Kontrollen die HtrA1-RNA-Expression um den Faktor 2 und die HtrA1-Proteinmenge um den Faktor 1,3 erhöht war. In einem zweiten Schritt wurden die Patienten in ihre Genotypen unterteilt und es wurde analysiert, ob der Genotyp Einfluss auf die HtrA1-RNA-Expression und HtrA1-Proteinmenge hatte. Das

Ergebnis zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem GG- und dem GA-Genotyp. Beim AA-Genotyp konnte eine erhöhte Expression des *HTRA1*-Gens festgestellt werden, aufgrund der geringen Anzahl der Patienten ist jedoch lediglich eine Tendenzaussage möglich.

4.8 Die Auswirkungen einer erhöhten HtrA1-Proteinmenge auf die Anreicherung des A β -Peptids in Gehirngewebe

Die Ablagerungen des A β -Peptids können auf verschiedene Wege abgebaut werden. Eine besondere Bedeutung hat der Abbau der Ablagerungen durch Proteasen. Der Transport über die Blut-Hirn-Schranke und Rezeptor-vermittelte Endozytose stellen ebenfalls wichtige Faktoren beim Abbau dar (Zlokovic, 2004).

Es sind verschiedene Proteasen bekannt, die in der Lage sind das A β -Peptid und seine Ablagerungen abzubauen. Das *Insulin Degrading Enzym* (IDE) proteolysiert lösliches intrazelluläres A β -Peptid (Farris *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 1998) und PLAU proteolysiert aggregiertes A β -Peptid (Tucker *et al.*, 2000). Neprilysin (NEP) spielt eine entscheidende Rolle beim Abbau von A β ₄₂-Peptiden und besitzt eine schützende Wirkung für Neuronen (Carson und Turner, 2002; Iwata *et al.*, 2001). Weiterführende *ex vivo* Studien haben gezeigt, dass die Zufuhr von NEP in einem Mausmodell die A β -Ablagerungen vermindert (Hemming *et al.*, 2007). Interessanterweise kann die Aktivität der Proteasen in unterschiedlichen Phasen der Krankheit beobachtet werden. So scheinen IDE und NEP eher eine funktionelle Relevanz bei Beginn der Erkrankung zu haben. PLAU hingegen scheint in einer späteren Phase der Erkrankung, die bereits extrazellulär angereicherten A β -Aggregate zu degradieren (Yan *et al.*, 2006).

Bemerkenswerterweise ist die HtrA1 Protease ebenfalls in der Lage verschiedene Fragmente von APP effizient abzubauen und ein HtrA1 spezifischer Inhibitor verursacht die Akkumulation von A β -Peptiden im Zellkulturüberstand von Astrozyten (Abb. 4. 2). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HtrA1 in Gehirngewebe von AD Patienten mit senilen Plaques und neurofibrillären Bündel kolokalisiert (Grau *et al.*, 2005).

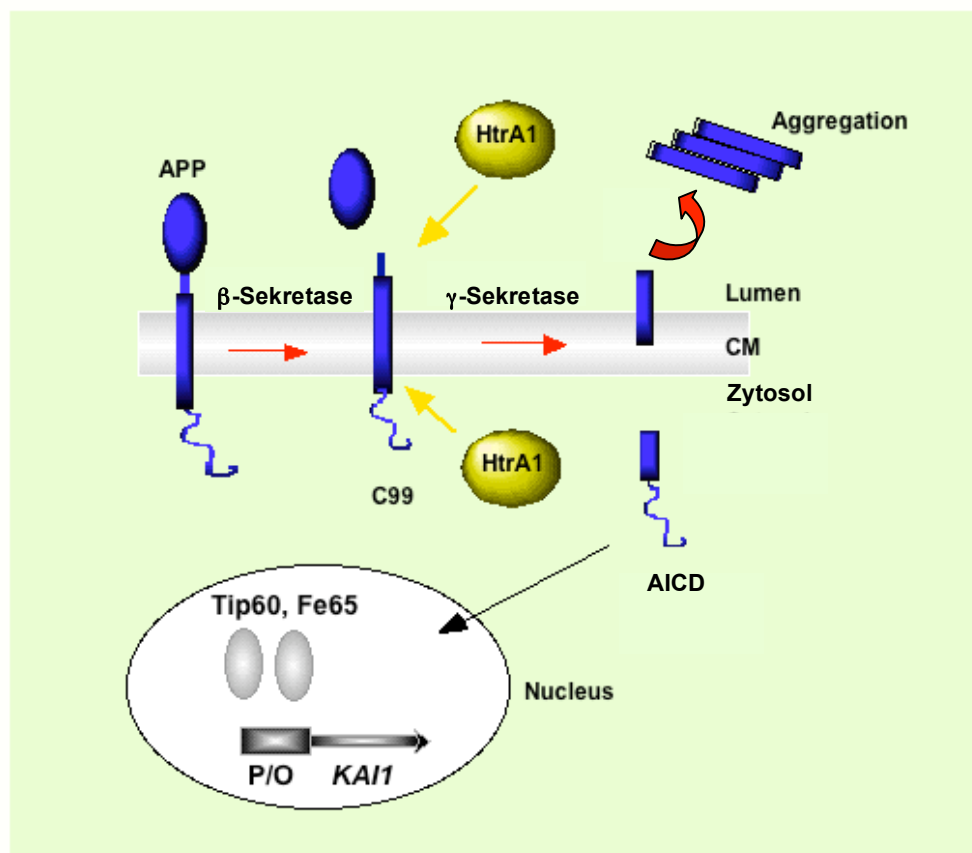


Abb. 4. 2 Modell des Abbaus von APP und seinen Fragmenten durch HtrA1

Das APP wird von der β-Sekretase geschnitten und anschließend von der γ-Sekretase prozessiert. Diese Prozessierung führt zu der Entstehung von Aβ-Aggregaten extrazellulär und zu einer Signalkaskade intrazellulär durch AICD. Ein alternativer Weg ist die Prozessierung von APP Fragmenten durch die sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre lokalisierte HtrA1 Protease (entnommen aus Ehrmann und Clausen, 2004).

Die Arbeiten von Grau *et al.* haben die Frage offen gelassen, ob eine Korrelation zwischen der Aβ- und HtrA1-Proteinmenge im Kortex von AD Patienten und Kontrollen bestimmen werden kann. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden in Gehirngewebe die Aβ-Peptidmenge quantitativ analysiert und mit der, in dieser Arbeit bereits ermittelten, HtrA1-Proteinmengen korreliert. Das Ergebnis zeigte, dass sowohl bei den AD Patienten als auch bei den Kontrollen keine signifikante Korrelation bestimmt werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass bei den AD Patienten die Aβ- und die HtrA1-Proteinmenge gemeinsam anstieg. Das gegenteilige Ergebnis konnte bei den Kontrollen beobachtet werden. Eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge führte zu einer erniedrigten Aβ-Peptidmenge. Es ist denkbar, dass bei den Kontrollen die proteolytische Aktivität von HtrA1 ausreichte, um die Aβ-Peptidmenge zu reduzieren. Möglicherweise ist bei den AD

Patienten die proteolytische Aktivität von HtrA1 und die damit verbundene Protein-Qualitätskontrolle aufgrund der erhöhten A β -Peptidmenge oder anderer Faktoren nicht mehr gewährleistet.

Interessanterweise konnte bei einem anderen Mitglied der HtrA-Familie, dem mitochondriale HtrA2-Protein, eine Rolle beim Abbau von APP in den Mitochondrien zugesprochen werden (Suzuki *et al.*, 2001; Uren *et al.*, 2005). Die Akkumulation von APP führt zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien (Anandatheerthavarada *et al.*, 2003). Dieses Ereignis kann durch eine Aktivierung von HtrA2 *in vitro* und *in vivo* verhindert werden (Park *et al.*, 2006). Die Protease schneidet APP, so dass ein C-terminales Fragment entsteht, bestehend aus den As 525-695 des APP₆₉₅, welches in das Zytosol abgegeben wird. Ist die Protease aktiv, kann die Akkumulation und die daraus entstehende toxische Wirkung verhindert werden (Park *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis, dass die Mitglieder der HtrA-Familie der Toxizität des APP entgegenwirken.

Um die Bedeutung von HtrA1 beim Abbau des A β -Peptids weiter zu analysieren, wurden tg2576 Mäuse mit HtrA1 *knockout* Mäusen gekreuzt. Die tg2576 Mäuse exprimieren die schwedische Doppelmutante des APP (K670 und M671L) (Hsiao *et al.*, 1996). Sie zeigen nach 6 Monaten Beeinträchtigungen in ihrem Erinnerungsvermögen. Zu diesem Zeitpunkt können erhöhte Mengen an löslichen A β Oligomeren detektiert werden (Westerman *et al.*, 2002). Nach 12 bis 23 Monaten treten erste Plaque-Ablagerungen auf und reichern sich im Laufe der Zeit an.

Interessanterweise konnte bei den tg2576 Mäusen nach 6-8 Monaten, bevor Plaque-Ablagerungen nachgewiesen werden konnten, ein Anstieg des mitochondrialen Hitzeschockproteins 70 als Folge einer Stressantwort bestimmt werden (Gillardon *et al.*, 2007).

Um die Wirksamkeit der HtrA1 Protease auf die Entstehung der Plaque-Ablagerungen zu analysieren wurden die A β -Peptidmenge in den gekreuzten tg2576 x HtrA1 *knockout* Mäusen quantifiziert. Es wurden nur Mäuse analysiert die zwischen 4-13 Monat alt waren, bevor große A β -Ablagerungen detektiert werden konnten. Die Auswertung ergab, dass verglichen mit tg2576 Mäusen die HtrA1 exprimieren, der homozygot *knockout* von HtrA1 zu einer 2,8-fach erhöhten A β ₄₂-Peptidmenge führte. Die A β ₄₀-Peptidmenge war in den *knockout* Mäusen um das 2,3-fache erhöht. Da die Mäuse unterschiedlich alt waren, schwankte die A β -Peptidmenge sehr stark innerhalb einer Gruppe. Die Mäuse wurden deshalb in vier Altersgruppen eingeteilt und die A β Anreicherung wurde in einem

zeitlichen Verlauf analysiert. Der Effekt der Expression von HtrA1 auf die Anreicherung des A β -Peptids war eindeutig. Mäuse die HtrA1 exprimierten, zeigten eine verzögerte Ansammlung des A β -Peptids im Gegensatz zu den *knockout* Mäusen. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass HtrA1 den Erkrankungsbeginn von AD verzögert. Damit wurde ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der HtrA1 Protease in der Protein-Qualitätskontrolle bei AD erbracht.

Ein funktioneller Zusammenhang von Hitzeschockproteinen und dem Abbau von aggregierten Proteinen konnte bereits in anderen neurodegenerativen Erkrankungen gezeigt werden. So führt die Inaktivierung des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors 1 in *C. elegans* zu einer Anreicherung von Polyglutamin-Oligomeren, wie bei *Chorea Huntington* und zu einer verkürzten Lebensspanne (Morimoto, 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Chaperone, die ein Teil der Protein-Qualitätskontrolle sind, wie Hsp70 und Hsp40, ebenfalls Polyglutamin-Aggregationen abbauen können (Barral *et al.*, 2004). Aufgrund der wachsenden Erkenntnis über Hitzeschockproteine können immer mehr Rückschlüsse über ihre Bedeutung bei neuronalen Erkrankungen getroffen werden. Sie scheinen wichtige Kandidaten zu sein, die den Ausbruch einer Amyloid-Erkrankung verlangsamen oder sogar verhindern können.

4.9 Ausblick: Identifizierung von geeigneten HtrA1-Aktivatoren und weiterführende Charakterisierung der Protease

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei HtrA1 um eine wirksame Protease handelt, die in der Lage ist tau-Proteine und seine Aggregate effizient abzubauen. Die Tatsache, dass in Gehirngewebe von AD Patienten eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer reduzierten tau-Proteinmenge führt, macht HtrA1 für eine Therapie interessant. Ziel der Forschung sollte deshalb eine spezifische Steigerung der enzymatischen Aktivität von HtrA1 sein.

Die Bedeutung der HtrA1 Protease beim Abbau von aggregierten tau-Proteinen in Gehirngewebe spielt nicht nur bei AD eine Rolle, sondern auch bei einer Reihe von anderen neurodegenerativen Krankheiten. So findet man tau-Aggregate nicht nur in Gehirngewebe von AD Patienten, sondern auch bei frontotemporalen Demenzen, Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17) und weiteren Krankheiten, die

unter dem Begriff „Tauopathien“ zusammengefasst werden (Brandt *et al.*, 2005). All diesen Erkrankungen ist eine abnormale Aggregation des tau-Proteins zu intrazellulären PHFs, die sich zu höher strukturierten neurofibrillären Bündel zusammenlagern, gemeinsam. Als Folge der Zusammenlagerung kommt es zum Absterben der betroffenen Nervenzellen (Spillantini und Goedert, 1998). Eine wirksame tau Protease könnte demzufolge bei allen Tauopathien als möglicher Therapieansatz verwendet werden.

Mittles eines *High Throughput Screen* (HTS) kann der in dieser Arbeit etablierte Enzymtest mit mehreren tausend Substraten, z.B. abgeleitet von Naturstoffen, inkubiert werden, um eine Aktivierung oder Inhibierung der enzymatischen Aktivität von HtrA1 zu bestimmen. Die Identifikation von bislang noch unbekannten Aktivatoren und Inhibitoren kann zu einem besseren Verständnis des Funktionsspektrums von HtrA1 beitragen. Die Spezifität eines Aktivators könnte anschließend biochemisch, zellbiologisch und *in vivo* analysiert werden.

Dass HtrA1 eine starke Präferenz zu fehlgefalteten Proteinen zeigt konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Bei der Suche nach weiteren Substraten sollten Proteine, die in der Lage sind *cross-β* Strukturen auszubilden und im Mittelpunkt von neurodegenerativen Erkrankungen stehen, als mögliche Substrate von HtrA1 analysiert werden. Ein besonders interessanter Kandidat stellt in diesem Zusammenhang α -Synuclein dar, welches für den Nervenzelltod von Motorneuronen in der Parkinson-Erkrankung maßgeblich verantwortlich ist.

Die Reinigung von nativem HtrA1-Protein und die anschließende Analyse der Protease könnte wichtige Hinweise über die Funktion der mac25 Domäne liefern. Eine biochemische Charakterisierung des nativen HtrA1-Proteins kann Rückschlüsse über die Temperatur-, pH- und Salz-Toleranz der Protease liefern.

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Mengen an pseudohyperphosphoryliertem tau intrazellulär eine Stressantwort in den PC12 Zellen hervorruft. HtrA1 stellt ein Teil dieser Stressantwort dar. Von großem Interesse wäre es mit Hilfe der Chiptechnologie ein RNA-Expressionsprofil in den PHP-tau PC12 Zellen und in den Kontroll PC12 Zellen zu erstellen. Diese Technologie stellt ein neues Verfahren dar um quantitative Aussagen über das Expressionsniveau der Gene eines gesamten Genoms in einem Arbeitsgang in sehr kurzer Zeit zu gewinnen. Das Expressionsniveau in den PHP-tau PC12 Zellen kann mit den Kontroll PC12 Zellen verglichen werden, um zu bestimmen welche Gene ein verändertes Expressionsniveau aufweisen. Die Auswertung des Tests kann Rückschlüsse

zulassen, welche anderen Gene an der tau induzierten Stressantwort beteiligt sind. Außerdem könnte eine mögliche Signalkaskade nachgewiesen werden, die zu einer erhöhten Expression von HtrA1 führt.

Ebenfalls von großem Interesse ist die Tatsache, dass eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge zu einer reduzierten tau-Proteinmenge in den PC12 Zelllinien führt. Die Hemmung der HtrA1-RNA-Expression war jedoch nicht möglich. Mit Hilfe eines induzierbaren Systems könnte die Hemmung der HtrA1-RNA-Expression gezielt durchgeführt werden und die Auswirkungen der Hemmung könnten analysiert werden. Dieses Experiment könnte Rückschlüsse über die protektive Wirkung von HtrA1 in Zellen zulassen.

Mutationen im *TAU*-Gen, welche in Verbindung mit FTDP-17 stehen, führen in Mäusen zu Aggregation des tau-Proteins und damit verbunden zu einem Funktionsverlust. Die Folge sind Neurodegenerationen und Demenz bei den Mäusen (Gotz, 2001). Ein weiteres Ziel sollte sein, diese Mäuse mit HtrA1 *knockout* Mäusen zu kreuzen und den Effekt auf die Anreicherung der tau-Proteinmenge zu analysieren. Zusätzlich sollten Verhaltensstudien mit den Tieren durchgeführt werden. Geeignete Aktivatoren, die mittels HTS identifiziert werden, könnten *in vivo* an Mäusen getestet werden, um sie als mögliches Medikament zu testen.

Die Aktivierung einer geeigneten Protease, die sowohl die Entstehung der tau- als auch die A β -Ablagerungen verhindern kann, stellt eine neue Strategie für eine hochsensitive Therapie dar. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann HtrA1 als vielversprechendes therapeutisches Instrument zur Behandlung von AD angesehen werden.

5. Zusammenfassung

Die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung (AD) hängt maßgeblich von der Anreicherung intrazellulärer und extrazellulärer Protein-Ablagerungen ab. Der Hauptbestandteil der intrazellulären Ablagerungen ist das hyperphosphorylierte tau-Protein und die extrazellulären Ablagerungen werden hauptsächlich aus den A β -Peptiden gebildet. In der Literatur sind einige Proteasen beschrieben, die das A β -Peptid und seine Ablagerungen abbauen können. Interessanterweise konnte eine gleichwertige tau Protease nicht identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der konservierten Serinprotease HtrA1 bei AD analysiert. Im ersten Teil wurde mit Hilfe von biochemischen Methoden gezeigt, dass HtrA1 in der Lage ist lösliche tau-Varianten abzubauen. Dabei hatte die Phosphorylierung bzw. Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins auf die enzymatische Aktivität von HtrA1 keinen relevanten Effekt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die entstandenen tau-Fragmente ihre Fähigkeit zur Aggregation verloren hatten, da die Regionen die maßgeblich an der Aggregation beteiligt sind, vollständig von HtrA1 abgebaut wurden. Außerdem wurde aus Gehirnen von AD Patienten tau-Ablagerungen (größer als 1 MDA) isoliert. Bemerkenswerterweise konnte HtrA1 auch diese Ablagerungen abbauen, wodurch HtrA1 als wirksame tau Protease ausgezeichnet wird.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob HtrA1 *in vivo* in der Lage ist tau abzubauen. Hierfür wurde in PC12 Zellen mittels Western-Blot gezeigt, dass eine Überexpression von HtrA1 eine starke Reduktion der wt-tau- und der pseudohyperphosphorylierten-tau-Proteinmenge zur Folge hatte.

In weiterführenden zellbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Menge an tau zu einer erhöhten Expression des *HTRA1*-Gens führte. Dabei hatte die Pseudohyperphosphorylierung des tau-Proteins einen additiven Effekt auf die HtrA1-RNA-Expression. Wurde die tau-Menge dagegen extrazellulär erhöht, führte dies zu keiner erhöhten HtrA1-RNA-Expression aber zu einem Anstieg der extrazellulären HtrA1-Proteinmenge. Somit scheinen erhöhte tau-Mengen zu einer bisher unbekannten zellulären Stressantwort zu führen an welcher HtrA1 beteiligt zu sein scheint.

Mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie wurde in U373-MG Zellen die subzelluläre Lokalisation von HtrA1 untersucht. Es konnte eine Lokalisation von HtrA1 am Mikrotubuli-Netzwerk und zusätzlich eine Kolo­kalisation mit tau nachgewiesen werden.

In Gehirngewebe von AD Patienten korrelierte eine erhöhte HtrA1-Proteinmenge signifikant mit einer verminderten Anreicherung des nativen und hyperphosphorylierten tau-Proteins. Bei den Kontrollen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Anhand dieser Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass HtrA1 ein Teil der Protein-Qualitätskontrolle bei AD ist.

Kürzlich wurde ein einzelner Nukleotid Polymorphismus im *HTRA1*-Promotor als genetischer Risikofaktor für die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) beschrieben (Dewan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Aufgrund pathophysiologischer Gemeinsamkeiten von AMD und AD, wurde in dieser Arbeit auch die mögliche funktionelle Bedeutung des Polymorphismus bei AD untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus keinen Einfluss auf die Expression von HtrA1 hatte und demzufolge kein Risikofaktor für AD darstellt.

Die Arbeiten von Grau *et al.* haben HtrA1 als A β Protease charakterisiert (Grau *et al.*, 2005). Um zu zeigen, dass die Funktion von HtrA1 auch *in vivo* relevant ist, wurde die A β -Peptidmenge in tg2576 Mäusen und in tg2576 x HtrA1 *knockout* Mäusen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der *knockout* von HtrA1 eine Anreicherung des A β ₄₂-Peptids bzw. des A β ₄₀-Peptids in Gehirngewebe zur Folge hatte. Somit konnte die Relevanz von HtrA1 auch im AD-Mausmodell gezeigt werden.

AD ist bis heute nicht heilbar. Die Etablierung von effizienten Therapiestrategien ist notwendig, um die Prognose der Erkrankten zu verbessern. Ein möglicher Therapieansatz ist der Abbau der pathologischen Ablagerungen durch Proteasen. Eine gezielte Erhöhung der proteolytischen Aktivität einer geeigneten Protease könnte als Strategie für neue Verfahren verwendet werden. In dieser Arbeit wurde HtrA1 als wirksame tau und A β Protease beschrieben, dadurch rückt HtrA1 in den Fokus für neue Therapiestrategien.

6. Literatur

- Ades, S. E., et al. (1999), 'The Escherichia coli sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor', *Genes Dev*, 13 (18), 2449-61.
- Alba, B. M., et al. (2001), 'degS (hhoB) is an essential Escherichia coli gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity', *Mol Microbiol*, 40 (6), 1323-33.
- Alba, B. M., et al. (2002), 'DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response', *Genes Dev*, 16 (16), 2156-68.
- Alberts B., et al. (1997), 'Das Cytoskelett In: Lehrbuch der molekularen Zellbiologie' *VCH-Verlagsgesellschaft*, Weinheim, Deutschland. (3. Auflage), 931-1018.
- Almeida, et al. (2006), 'Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system', *J Neurosci*, 26 (16), 4277-88.
- Alzheimer A. (1907), 'Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde', *Allg. Z. Psychatrie* (64), 146-148.
- Anandatheerthavarada, H. K., et al. (2003), 'Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells', *J Cell Biol*, 161 (1), 41-54.
- Asai, M., et al. (2003), 'Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase', *Biochem Biophys Res Commun*, 301 (1), 231-5.
- Avila, J. (2006), 'Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology', *FEBS Lett*, 580 (12), 2922-7.
- Baldi, A., et al. (2002), 'The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells', *Oncogene*, 21 (43), 6684-8.
- Barghorn, S., et al. (2005), 'Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease', *J Neurochem*, 95 (3), 834-47.
- Barral, J. M., et al. (2004), 'Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases', *Semin Cell Dev Biol*, 15 (1), 17-29.

- Bass, S., et al. (1996), 'Multicopy suppressors of *prc* mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA', *J Bacteriol*, 178 (4), 1154-61.
- Baumann, K., et al. (1993), 'Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5', *FEBS Lett*, 336 (3), 417-24.
- Beebe, K. D., et al. (2000), 'Substrate recognition through a PDZ domain in tail-specific protease', *Biochemistry*, 39 (11), 3149-55.
- Berriman, J., et al. (2003), 'Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (15), 9034-8.
- Bertram, L., et al. (2000), 'Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q', *Science*, 290 (5500), 2302-3.
- Betton, J. M., et al. (1998), 'Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*', *J Biol Chem*, 273 (15), 8897-902.
- Binder, L. I., et al. (1985), 'The distribution of tau in the mammalian central nervous system', *J Cell Biol*, 101 (4), 1371-8.
- Bitan, G., et al. (2003), 'Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (1), 330-5.
- Braak, E., et al. (1994), 'A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads', *Acta Neuropathol*, 87 (6), 554-67.
- Brandt, R., et al. (2005), 'Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models', *Biochim Biophys Acta*, 1739 (2-3), 331-54.
- Brandt, R., et al. (2009), 'A *Caenorhabditis elegans* model of tau hyperphosphorylation: induction of developmental defects by transgenic overexpression of Alzheimer's disease-like modified tau', *Neurobiol Aging*, 30 (1), 22-33.
- Buee, L., et al. (2000), 'Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders', *Brain Res Brain Res Rev*, 33 (1), 95-130.
- Butner, K. A. and Kirschner, M. W. (1991), 'Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites', *J Cell Biol*, 115 (3), 717-30.
- Carmel, G., et al. (1996), 'The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology', *J Biol Chem*, 271 (51), 32789-95.
- Carson, J. A. and Turner, A. J. (2002), 'Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?', *J Neurochem*, 81 (1), 1-8.

- Chai, Y., et al. (1999), 'Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease', *J Neurosci*, 19 (23), 10338-47.
- Chien, J., et al. (2004), 'A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer', *Oncogene*, 23 (8), 1636-44.
- Chien, J., et al. (2006), 'Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity', *J Clin Invest*, 116 (7), 1994-2004.
- Chien, J., and Shridhar, V. (2009), 'Identification of tubulins as substrates of serine protease HtrA1 by mixture-based oriented peptide library screening', *J Cell Biochem*.
- Chirita, C. N. and Kuret, J. (2004), 'Evidence for an intermediate in tau filament formation', *Biochemistry*, 43 (6), 1704-14.
- Chiti, F. and Dobson, C. M. (2006), 'Protein misfolding, functional amyloid, and human disease', *Annu Rev Biochem*, 75, 333-66.
- Chung, C. T., et al. (1989), 'One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (7), 2172-5.
- Clausen, T., et al. (2002), 'The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate', *Mol Cell*, 10 (3), 443-55.
- Clawson, G. A., et al. (2008), 'Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins', *J Cell Biochem*, 105 (1), 81-8.
- Crowther, R. A. (1991), 'Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (6), 2288-92.
- De Las Penas, A., et al. (1997), 'SigmaE is an essential sigma factor in Escherichia coli', *J Bacteriol*, 179 (21), 6862-4.
- De Luca, A., et al. (2004), 'The serine protease HtrA1 is upregulated in the human placenta during pregnancy', *J Histochem Cytochem*, 52 (7), 885-92.
- De Vrij, F. M., et al. (2004), 'Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system', *Prog Neurobiol*, 74 (5), 249-70.
- Derkinderen, P., et al. (2005), 'Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase', *J Neurosci*, 25 (28), 6584-93.

- Dewan, A., et al. (2006), 'HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration', *Science*, 314 (5801), 989-92.
- Dickey, C., et al. (2009), 'Aging analysis reveals slowed tau turnover and enhanced stress response in a mouse model of tauopathy', *Am J Pathol*, 174 (1), 228-38.
- Drewes, G., et al. (1992), 'Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state', *EMBO J*, 11 (6), 2131-8.
- Drewes, G., et al. (1995), 'Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262', *J Biol Chem*, 270 (13), 7679-88.
- Drewes, G., et al. (1997), 'MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption', *Cell*, 89 (2), 297-308.
- Drubin, D. G. and Kirschner, M. W. (1986), 'Tau protein function in living cells', *J Cell Biol*, 103 (6 Pt 2), 2739-46.
- Eckman, E. A., et al. (2001), 'Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme', *J Biol Chem*, 276 (27), 24540-8.
- Edbauer, D., et al. (2003), 'Reconstitution of gamma-secretase activity', *Nat Cell Biol*, 5 (5), 486-8.
- Ehrmann, M. and Clausen, T. (2004), 'Proteolysis as a regulatory mechanism', *Annu Rev Genet*, 38, 709-24.
- Esler, W. P. and Wolfe, M. S. (2001), 'A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces', *Science*, 293 (5534), 1449-54.
- Faccio, L., et al. (2000), 'Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia', *J Biol Chem*, 275 (4), 2581-8.
- Faller, E. M. and Brown, D. L. (2009), 'Modulation of microtubule dynamics by the microtubule-associated protein 1a', *J Neurosci Res*, 87 (5), 1080-9.
- Farris, W., et al. (2004), 'Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein', *Am J Pathol*, 164 (4), 1425-34.
- Fath, T., et al. (2002), 'Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease', *J Neurosci*, 22 (22), 9733-41.

- Fraering, P. C., et al. (2004), 'Purification and characterization of the human gamma-secretase complex', *Biochemistry*, 43 (30), 9774-89.
- Friedhoff, P., et al. (2000), 'Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments', *Biochim Biophys Acta*, 1502 (1), 122-32.
- Galvan, M., et al. (2001), 'Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2', *J Alzheimers Dis*, 3 (4), 417-25.
- Gamblin, T. C., et al. (2003), 'Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (17), 10032-7.
- Garcia, M. L. and Cleveland, D. W. (2001), 'Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease', *Curr Opin Cell Biol*, 13 (1), 41-8.
- Giffard, R. G., et al. (2004), 'Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury', *J Exp Biol*, 207 (Pt 18), 3213-20.
- Gillardon, F., et al. (2007), 'Proteomic and functional alterations in brain mitochondria from Tg2576 mice occur before amyloid plaque deposition', *Proteomics*, 7 (4), 605-16.
- Gilleard, C. J., et al. (1993), 'The St. George's dementia bed investigation study: cardiovascular, neurological and neuropsychological correlates', *Acta Psychiatr Scand*, 87 (4), 273-8.
- Goedert, M. (1996), 'Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease', *Ann N Y Acad Sci*, 777, 121-31.
- Goode, B. L., et al. (2000), 'Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease', *J Biol Chem*, 275 (49), 38182-9.
- Gotz, J. (2001), 'Tau and transgenic animal models', *Brain Res Brain Res Rev*, 35 (3), 266-86.
- Gotz, J., et al. (2004), 'Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy', *Mol Psychiatry*, 9 (7), 664-83.
- Gotz, J., et al. (2008), 'Functional genomics dissects pathomechanisms in tauopathies: mitosis failure and unfolded protein response', *Neurodegener Dis*, 5 (3-4), 179-81.
- Grau, S., et al. (2005), 'Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (17), 6021-6.

- Grau, S., et al. (2006), 'The role of human HtrA1 in arthritic disease', *J Biol Chem*, 281 (10), 6124-9.
- Gray, C. W., et al. (2000), 'Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response', *Eur J Biochem*, 267 (18), 5699-710.
- Gustke, N., et al. (1992), 'The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs', *FEBS Lett*, 307 (2), 199-205.
- Gustke, N., et al. (1994), 'Domains of tau protein and interactions with microtubules', *Biochemistry*, 33 (32), 9511-22.
- Haass, C. (2004), 'Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation', *EMBO J*, 23 (3), 483-8.
- Hageman, G. S., et al. (2001), 'An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration', *Prog Retin Eye Res*, 20 (6), 705-32.
- Hanahan, D. (1983), 'Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids', *J Mol Biol*, 166 (4), 557-80.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002), 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297 (5580), 353-6.
- Harris, B. Z. and Lim, W. A. (2001), 'Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly', *J Cell Sci*, 114 (Pt 18), 3219-31.
- Harrison, S. C. (1996), 'Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains', *Cell*, 86 (3), 341-3.
- Hasenbein, S., et al. (2007), 'Determinants of regulated proteolysis in signal transduction', *Genes Dev*, 21 (1), 6-10.
- Hashimoto, M., et al. (2003), 'Transgenic models of alpha-synuclein pathology: past, present, and future', *Ann N Y Acad Sci*, 991, 171-88.
- Hasselblatt, H., et al. (2007), 'Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress', *Genes Dev*, 21 (20), 2659-70.
- Haupt, M., et al. (1991), 'Symptom progression in Alzheimer's disease', *J Am Geriatr Soc*, 39 (6), 639.

- Hemming, M. L., et al. (2007), 'Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease', *PLoS Med*, 4 (8), e262.
- Hirokawa, N. (1993), 'Axonal transport and the cytoskeleton', *Curr Opin Neurobiol*, 3 (5), 724-31.
- Hong, M., et al. (1997), 'Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3', *J Biol Chem*, 272 (40), 25326-32.
- Hou, J., et al. (2005), 'Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5', *J Cell Biochem*, 94 (3), 470-84.
- Hsiao, K., et al. (1996), 'Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice', *Science*, 274 (5284), 99-102.
- Hu, S. I., et al. (1998), 'Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage', *J Biol Chem*, 273 (51), 34406-12.
- Hu, J., et al. (2001), 'Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity', *J Biol Chem*, 276 (51), 47863-8.
- Huse, J. T., et al. (2000), 'Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase', *J Biol Chem*, 275 (43), 33729-37.
- Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (1996), 'Molecular mechanism of Alzheimer's neurofibrillary degeneration and therapeutic intervention', *Ann N Y Acad Sci*, 777, 132-8.
- Iqbal, K., et al. (2005), 'Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies', *Biochim Biophys Acta*, 1739 (2-3), 198-210.
- Ishiguro, K., et al. (1993), 'Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments', *FEBS Lett*, 325 (3), 167-72.
- Iwata, N., et al. (2001), 'Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin', *Science*, 292 (5521), 1550-2.
- Johnson, G. V. and Hartigan, J. A. (1999), 'Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update', *J Alzheimers Dis*, 1 (4-5), 329-51.

- Johnson, L. V., et al. (2001), 'Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration', *Exp Eye Res*, 73 (6), 887-96.
- Johnson, L. V., et al. (2002), 'The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (18), 11830-5.
- Jones, J. M., et al. (2003), 'Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice', *Nature*, 425 (6959), 721-7.
- Kaiser, E. T., et al. (1985), 'The chemical modification of enzymatic specificity', *Annu Rev Biochem*, 54, 565-95.
- Kamboh, M. I., et al. (1995), 'APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism', *Nat Genet*, 10 (4), 486-8.
- Kamboh, M. I. (2004), 'Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease', *Ann Hum Genet*, 68 (Pt 4), 381-404.
- Kampers, T., et al. (1996), 'RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments', *FEBS Lett*, 399 (3), 344-9.
- Kang, J., et al. (1987), 'The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor', *Nature*, 325 (6106), 733-6.
- Kato, M. V. (2000), 'A secreted tumor-suppressor, mac25, with activin-binding activity', *Mol Med*, 6 (2), 126-35.
- Keck, S., et al. (2003), 'Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease', *J Neurochem*, 85 (1), 115-22.
- Keiler, K. C., et al. (1996), 'Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA', *Science*, 271 (5251), 990-3.
- Kenessey, A. and Yen, S. H. (1993), 'The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments', *Brain Res*, 629 (1), 40-6.
- Kenessey, A., et al. (1997), 'Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration', *J Neurochem*, 69 (5), 2026-38.
- Kienlen-Campard, P., et al. (2002), 'Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis', *J Biol Chem*, 277 (18), 15666-70.

- Kim, D. Y., et al. (2003), 'Crystal structure of the protease domain of a heat-shock protein HtrA from *Thermotoga maritima*', *J Biol Chem*, 278 (8), 6543-51.
- Kimberly, W. T., et al. (2003), 'Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (11), 6382-7.
- Kishi, M., et al. (2005), 'Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization', *Science*, 307 (5711), 929-32.
- Klemes, Y., et al. (1981), 'Properties of abnormal proteins degraded rapidly in reticulocytes. Intracellular aggregation of the globin molecules prior to hydrolysis', *J Biol Chem*, 256 (16), 8436-44.
- Klucken, J., et al. (2004), 'Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity', *J Biol Chem*, 279 (24), 25497-502.
- Kolmar, H., et al. (1996), 'The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation', *J Bacteriol*, 178 (20), 5925-9.
- Koo, E. H., et al. (1990), 'Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (4), 1561-5.
- Kosik, K. S., et al. (1986), 'Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (11), 4044-8.
- Krojer, T., et al. (2002), 'Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine', *Nature*, 416 (6879), 455-9.
- Krojer, T., et al. (2008), 'Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (22), 7702-7.
- Kuret, J., et al. (2005), 'Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization', *Microsc Res Tech*, 67 (3-4), 141-55.
- Kurz A. (1997), 'Klinische Diagnose der Alzheimer-Krankheit', In: *Handbuch Morbus Alzheimer*. Psychologie Verlags Union, Weinheim, Deutschland. (1. Auflage), 617-644
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227 (5259), 680-5.
- Launay, S., et al. (2008), 'HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival', *Cell Death Differ*, 15 (9), 1408-16.

- Ledesma, M. D., et al. (1994), 'Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments', *J Biol Chem*, 269 (34), 21614-9.
- Lee, V. M., et al. (1991), 'A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau', *Science*, 251 (4994), 675-8.
- Lee, G., et al. (1998), 'Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases', *J Cell Sci*, 111 (Pt 21), 3167-77.
- Lee, V. M., et al. (2001), 'Neurodegenerative tauopathies', *Annu Rev Neurosci*, 24, 1121-59.
- Lee, G. (2005), 'Tau and src family tyrosine kinases', *Biochim Biophys Acta*, 1739 (2-3), 323-30.
- Lee, E. K., et al. (2006), 'Cytosolic amyloid-beta peptide 42 escaping from degradation induces cell death', *Biochem Biophys Res Commun*, 344 (2), 471-7.
- Lesne, S., et al. (2006), 'A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory', *Nature*, 440 (7082), 352-7.
- Li, W., et al. (2002a), 'Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi', *Nat Struct Biol*, 9 (6), 436-41.
- Li, Y. J., et al. (2002b), 'Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled', *Am J Hum Genet*, 70 (4), 985-93.
- Lindersson, E., et al. (2004), 'Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers', *J Biol Chem*, 279 (13), 12924-34.
- Lindquist, S. (1986), 'The heat-shock response', *Annu Rev Biochem*, 55, 1151-91.
- Lipinska, B., et al. (1988), 'Sequence analysis and regulation of the htrA gene of Escherichia coli: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription', *Nucleic Acids Res*, 16 (21), 10053-67.
- Litersky, J. M. and Johnson, G. V. (1995), 'Phosphorylation of tau in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis', *J Neurochem*, 65 (2), 903-11.
- Lovestone, S., et al. (1996), 'Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules', *Neuroscience*, 73 (4), 1145-57.
- Lu, Q., et al. (1993), 'p44mpk MAP kinase induces Alzheimer type alterations in tau function and in primary hippocampal neurons', *J Neurosci Res*, 35 (4), 439-44.
- Luibl, V., et al. (2006), 'Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers', *J Clin Invest* 116 (2), 378-85.

- Ly, L. P. and Handelsman, D. J. (2002), 'Muscle strength and ageing: methodological aspects of isokinetic dynamometry and androgen administration', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29 (1-2), 37-47.
- Magrane, J., et al. (2004), 'Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons', *J Neurosci*, 24 (7), 1700-6.
- Makin, O. S. and Serpell, L. C. (2005), 'Structures for amyloid fibrils', *FEBS J*, 272 (23), 5950-61.
- Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1998), 'Tau in Alzheimer's disease', *Trends Cell Biol*, 8 (11), 425-7.
- Mandelkow, E., et al. (2007), 'Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease', *Brain Pathol*, 17 (1), 83-90.
- Margittai, M. and Langen, R. (2004), 'Template-assisted filament growth by parallel stacking of tau', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (28), 10278-83.
- Martins, L. M., et al. (2004), 'Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice', *Mol Cell Biol*, 24 (22), 9848-62.
- Mazanetz, M. P. and Fischer, P. M. (2007), 'Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 6 (6), 464-79.
- McDonell, M. W., et al. (1977), 'Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels', *J Mol Biol*, 110 (1), 119-46.
- Mercken, M., et al. (1995), 'Differential sensitivity to proteolysis by brain calpain of adult human tau, fetal human tau and PHF-tau', *FEBS Lett*, 368 (1), 10-4.
- Misra, R., et al. (2000), 'Overexpression of protease-deficient DegP(S210A) rescues the lethal phenotype of Escherichia coli OmpF assembly mutants in a degP background', *J Bacteriol*, 182 (17), 4882-8.
- Mori, H., et al. (1987), 'Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease', *Science*, 235 (4796), 1641-4.
- Morimoto, R. I. (1998), 'Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators', *Genes Dev*, 12 (24), 3788-96.
- Morimoto, R. I. (2008), 'Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging', *Genes Dev*, 22 (11), 1427-38.

- Morishima-Kawashima, M. and Ihara, Y. (2002), 'Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau', *J Neurosci Res*, 70 (3), 392-401.
- Mukrasch, M. D., et al. (2005), 'Sites of tau important for aggregation populate {beta}-structure and bind to microtubules and polyanions', *J Biol Chem*, 280 (26), 24978-86.
- Mukrasch, M. D., et al. (2007), 'The "jaws" of the tau-microtubule interaction', *J Biol Chem*, 282 (16), 12230-9.
- Muller, U. and Kins, S. (2002), 'APP on the move', *Trends Mol Med*, 8 (4), 152-5.
- Mullis, K., et al. (1992), 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986', *Biotechnology*, 24, 17-27.
- Munoz-Montano, J. R., et al. (1997), 'Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons', *FEBS Lett*, 411 (2-3), 183-8.
- Nie, G. Y., et al. (2003), 'Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2', *Biochem J*, 371 (Pt 1), 39-48.
- Nie, C. L., et al. (2007a), 'Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells', *BMC Neurosci*, 8, 9.
- Nie, C. L., et al. (2007b), 'Formaldehyde at low concentration induces protein tau into globular amyloid-like aggregates in vitro and in vivo', *PLoS ONE*, 2 (7), e629.
- Novak, M., et al. (1993), 'Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament', *EMBO J*, 12 (1), 365-70.
- Oh, S., et al. (2005), 'Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells', *Mech Ageing Dev*, 126 (12), 1292-9.
- Oka, C., et al. (2004), 'HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins', *Development*, 131 (5), 1041-53.
- Olesen, O. F. (1994), 'Proteolytic degradation of microtubule associated protein tau by thrombin', *Biochem Biophys Res Commun*, 201 (2), 716-21.
- Ozturk, A., et al. (2007), 'Association of tagSNPs in the urokinase-plasminogen activator (PLAU) gene with Alzheimer's disease and associated quantitative traits', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B (1), 79-82.

- Paivio, A., et al. (2004), 'Unique physicochemical profile of beta-amyloid peptide variant Abeta1-40E22G protofibrils: conceivable neuropathogen in arctic mutant carriers', *J Mol Biol*, 339 (1), 145-59.
- Park, H. J., et al. (2006), 'Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria', *J Biol Chem*, 281 (45), 34277-87.
- Patil, S., et al. (2008), 'Brain region-specificity of palmitic acid-induced abnormalities associated with Alzheimer's disease', *BMC Res Notes*, 1, 20.
- Pericak-Vance, M. A., et al. (1991), 'Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage', *Am J Hum Genet*, 48 (6), 1034-50.
- Perry, G., et al. (1991), 'Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton', *J Neurosci*, 11 (6), 1748-55.
- Pfaffl, M. W., et al. (2002), 'Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR', *Nucleic Acids Res*, 30 (9), e36.
- Pfaffl, M. W., et al. (2004), 'Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations', *Biotechnol Lett*, 26 (6), 509-15.
- Philipp, M. and Bender, M. L. (1983), 'Kinetics of subtilisin and thiolsubtilisin', *Mol Cell Biochem*, 51 (1), 5-32.
- Plun-Favreau, H., et al. (2007), 'The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1', *Nat Cell Biol*, 9 (11), 1243-52.
- Ponting, C. P. (1997a), 'Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants', *Protein Sci*, 6 (2), 464-8.
- Ponting, C. P., et al. (1997b), 'PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites', *Bioessays*, 19 (6), 469-79.
- Prasher, V. P., et al. (1998), 'Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome', *Ann Neurol*, 43 (3), 380-3.
- Prouty, W. F. and Goldberg, A. L. (1972), 'Fate of abnormal proteins in E. coli accumulation in intracellular granules before catabolism', *Nat New Biol*, 240 (100), 147-50.
- Qiu, W. Q., et al. (1998), 'Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation', *J Biol Chem*, 273 (49), 32730-8.

- Renart, J., et al. (1979), 'Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (7), 3116-20.
- Reynolds, C. H., et al. (2000), 'Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta', *J Neurochem*, 74 (4), 1587-95.
- Rissman, R. A., et al. (2004), 'Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology', *J Clin Invest*, 114 (1), 121-30.
- Romero, P., et al. (2001), 'Sequence complexity of disordered protein', *Proteins*, 42 (1), 38-48.
- Rosen, R. and Ron, E. Z. (2002), 'Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response', *Mass Spectrom Rev*, 21 (4), 244-65.
- Sandbrink, R., et al. (1994), 'Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins', *J Biol Chem*, 269 (19), 14227-34.
- Sanger, F., et al. (1977), 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12), 5463-7.
- Savopoulos, J. W., et al. (2000), 'Expression, purification, and functional analysis of the human serine protease HtrA2', *Protein Expr Purif*, 19 (2), 227-34.
- Schubert, W., et al. (1991), 'Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites', *Brain Res*, 563 (1-2), 184-94.
- Schwab, C., et al. (1995), 'Relationship of amyloid beta/A4 protein to the neurofibrillary tangles in Guamanian parkinsonism-dementia', *Acta Neuropathol*, 90 (3), 287-98.
- Seitz, A., et al. (2002), 'Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c', *EMBO J*, 21 (18), 4896-905.
- Selkoe, D. J., et al. (1988), 'Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (19), 7341-5.
- Selkoe, D. J. (1991), 'Amyloid protein and Alzheimer's disease', *Sci Am*, 265 (5), 68-71, 74-6, 78.
- Selkoe, D. J. (1994), 'Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease', *Annu Rev Cell Biol*, 10, 373-403.

- Selkoe, D. J. (1998), 'The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease', *Trends Cell Biol*, 8 (11), 447-53.
- Selkoe, D. J. (1999), 'Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease', *Nature*, 399 (6738 Suppl), A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001a), 'Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (20), 11039-41.
- Selkoe, D. J. (2001b), 'Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy', *Physiol Rev*, 81 (2), 741-66.
- Sengupta, S., et al. (2006), 'Degradation of tau protein by puromycin-sensitive aminopeptidase in vitro', *Biochemistry*, 45 (50), 15111-9.
- Shapiro, A. L., et al. (1967), 'Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels', *Biochem Biophys Res Commun*, 28 (5), 815-20.
- Sherman, M. Y. and Goldberg, A. L. (2001), 'Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases', *Neuron*, 29 (1), 15-32.
- Shridhar, V., et al. (2002), 'Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization', *Cancer Res*, 62 (1), 262-70.
- Skorko-Glonek, J., et al. (1995), 'Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for Escherichia coli survival at elevated temperatures', *Gene*, 163 (1), 47-52.
- Skorko-Glonek, J., et al. (2007), 'Characterization of the chaperone-like activity of HtrA (DegP) protein from Escherichia coli under the conditions of heat shock', *Arch Biochem Biophys*, 464 (1), 80-9.
- Slunt, H. H., et al. (1994), 'Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP)', *J Biol Chem*, 269 (4), 2637-44.
- Sone, M., et al. (1997), 'Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase', *J Biol Chem*, 272 (10), 6174-8.
- Songyang, Z., et al. (1997), 'Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains', *Science*, 275 (5296), 73-7.
- Spiess, C., et al. (1999), 'A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein', *Cell*, 97 (3), 339-47.

- Spillantini, M. G. and Goedert, M. (1998), 'Tau protein pathology in neurodegenerative diseases', *Trends Neurosci*, 21 (10), 428-33.
- St George-Hyslop, P., et al. (1987), 'Search for the familial Alzheimer's disease gene', *J Neural Transm Suppl*, 24, 13-21.
- Steiner, H. and Haass, C. (2000), 'Intramembrane proteolysis by presenilins', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (3), 217-24.
- Strauch, K. L. and Beckwith, J. (1988), 'An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (5), 1576-80.
- Strittmatter, W. J., et al. (1993), 'Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (5), 1977-81.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986), 'Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes', *J Mol Biol*, 189 (1), 113-30.
- Sunde, M., et al. (1997), 'Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction', *J Mol Biol*, 273 (3), 729-39.
- Suzuki, Y., et al. (2001), 'A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death', *Mol Cell*, 8 (3), 613-21.
- Swamy, K. H., et al. (1983), 'Isolation and characterization of protease do from Escherichia coli, a large serine protease containing multiple subunits', *Arch Biochem Biophys*, 224 (2), 543-54.
- Takashima, A., et al. (1996), 'Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta', *Neurosci Lett*, 203 (1), 33-6.
- Tanzi, R. E., et al. (1987), 'Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus', *Science*, 235 (4791), 880-4.
- Terwel, D., et al. (2005), 'Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice', *J Biol Chem*, 280 (5), 3963-73.
- Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1995), 'Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases', *FASEB J*, 9 (15), 1570-6.

- Tucker, H. M., et al. (2000), 'The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates', *J Neurosci*, 20 (11), 3937-46.
- Turner, P. R., et al. (2003), 'Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory', *Prog Neurobiol*, 70 (1), 1-32.
- Uhland, K., et al. (2000), 'Determinants of translocation and folding of TreF, a trehalase of *Escherichia coli*', *J Biol Chem*, 275 (31), 23439-45.
- Uren, R. T., et al. (2005), 'Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes', *J Biol Chem*, 280 (3), 2266-74.
- Vassar, R., et al. (1999), 'Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE', *Science*, 286 (5440), 735-41.
- Verhagen, A. M., et al. (2002), 'HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins', *J Biol Chem*, 277 (1), 445-54.
- von Bergen, M., et al. (2000), 'Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (10), 5129-34.
- von Bergen, M., et al. (2005), 'Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure', *Biochim Biophys Acta*, 1739 (2-3), 158-66.
- von Bergen, M., et al. (2006), 'Spectroscopic approaches to the conformation of tau protein in solution and in paired helical filaments', *Neurodegener Dis*, 3 (4-5), 197-206.
- Waller, P. R. and Sauer, R. T. (1996), 'Characterization of degQ and degS, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease', *J Bacteriol*, 178 (4), 1146-53.
- Walsh, N. P., et al. (2003), 'OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain', *Cell*, 113 (1), 61-71.
- Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2004), 'Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease', *Neuron*, 44 (1), 181-93.
- Wasco, W., et al. (1992), 'Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (22), 10758-62.
- Weingarten, M. D., et al. (1975), 'A protein factor essential for microtubule assembly', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (5), 1858-62.

- Westerman, M. A., et al. (2002), 'The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease', *J Neurosci*, 22 (5), 1858-67.
- Westermarck, P., et al. (2005), 'Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis', *Amyloid*, 12 (1), 1-4.
- Wilken, C., et al. (2004), 'Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease', *Cell*, 117 (4), 483-94.
- Wilson, D. M. and Binder, L. I. (1997), 'Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease', *Am J Pathol*, 150 (6), 2181-95.
- Wischik, C. M., et al. (1988), 'Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (13), 4884-8.
- Wolfe, M. S. (2003), 'Gamma-secretase--intramembrane protease with a complex', *Sci Aging Knowledge Environ*, 2003 (11), PE7.
- Wolfe, M. S. (2007), 'When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease', *EMBO Rep*, 8 (2), 136-40.
- Yan, S. D., et al. (1994), 'Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (16), 7787-91.
- Yan, P., et al. (2006), 'Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ', *J Biol Chem*, 281 (34), 24566-74.
- Yang, Z., et al. (2006), 'A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration', *Science*, 314 (5801), 992-3.
- Zlokovic, B. V. (2004), 'Clearing amyloid through the blood-brain barrier', *J Neurochem*, 89 (4), 807-11.
- Zumbrunn, J. and Trueb, B. (1996), 'Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins', *FEBS Lett*, 398 (2-3), 187-92.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Darüber hinaus bedanke ich mich für die zahlreichen praktischen Hinweise und stete Diskussionsbereitschaft, welche sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Melisa Merdanovic für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Außerdem bedanke ich mich vielfach bei Nina Schmidt und Inga Irle für ihre Diskussionsbereitschaft zu aufgetretenen Problemen, die immer zu neuen Lösungsansätzen beitrugen.

Weiterhin möchte ich mich bei Helmut und Adam für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung im Labor bedanken.

Christiane, Juliane, Sonja, Nicolette, Michael und allen hier nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die netten Stunden in privater Runde.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich bei meinem Mann Stephen Tennstädt, dessen Schulter mir immer Halt gab.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Annette Tennstädt geb. Schubert

Geboren am 19.05.1980

In Frechen / Nordrhein-Westfalen

verheiratet

Ausbildung

| | |
|-----------|---|
| 2005-2008 | Anfertigung der Promotion an der Universität Duisburg-Essen im Institut für Mikrobiologie II Titel der Doktorarbeit: Die protektive Rolle der konservierten Serinprotease HtrA1 in der Alzheimerschen Krankheit |
| 2004-2005 | Anfertigung der Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut Titel der Diplomarbeit: In <i>vivo</i> - und in <i>vitro</i> -Studien zur Expression und Toxizität von Prion-Gen-verwandten Genen |
| 2003-2005 | Studium der Biologie an der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main |
| 2002-2003 | Auslandssemester in Biochemie an der University of Cardiff, Wales |
| 2000-2002 | Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz |
| 1991-2000 | Gymnasium Augustinerschule Friedberg / Hessen |
| 1990-1991 | Gymnasium der Deutschen Schule Genf |
| 1987-1990 | Grundschule der Deutschen Schule Genf |
| 1986-1987 | Städt. Gemeinschaftsgrundschule Grevenbroich Kapellen |

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die protektive Rolle der konservierten Serinprotease HtrA1 in der Alzheimerschen Krankheit“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Annette Tennstädt befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung: